

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



INTERVACION ESOFAGICA EN LA HERNIA
DIAFRAGMATICA EXPERIMENTAL

TESIS DOCTORAL

LEOPOLDO MARIA MARTINEZ MARTINEZ

Madrid, 2007

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



INERVACION ESOFAGICA EN LA HERNIA
DIAFRAGMATICA EXPERIMENTAL

TESIS DOCTORAL

LEOPOLDO MARIA MARTINEZ MARTINEZ

DIRECTOR

Dr Prof Juan Antonio Tovar Larrucea

Madrid, 2007

DEPARTAMENTO
DE CIRUGÍA PEDIÁTRICA,
Pº de la Castellana Nº 261
28046 Madrid
Tel: 91 727 70 19
Fax: 91 727 70 33

D. **Juan A. Tovar Larrucea**, Profesor Titular de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Departamento de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario La Paz declara

QUE el trabajo **"Inervación Esofágica en la Hernia Diafragmática Experimental"** presentado por el licenciado en Medicina D. **Leopoldo Martinerz Martinez** para optar al Título de Doctor ha sido realizado enteramente en nuestro Departamento y bajo mi dirección.

QUE representa un meritorio esfuerzo para indagar las posibles causas de disfunción del tracto digestivo superior en los pacientes con Hernia Diafragmática Congénita.

QUE ha sido realizado con objetivos claramente establecidos, metodología científica adecuada y rigor en la evaluación de los resultados obtenidos así como con claridad expositiva.

QUE se trata de una aportación de valor científico indudables que reúne todos los requisitos para ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Lo que hago constar en Madrid a 2 de Abril de 2007

Prof. Dr. Juan A Tovar Larrucea

Este estudio ha sido realizado en el laboratorio experimental del Hospital Universitario La Paz con ayudas del FONDO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA números 01/0532 y 03/0892, de una Beca de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP) y de ayudas de la Fundación para la Investigación Médica Mutua Madrileña.

AGRADECIMIENTOS

Dos son las personas que me han acompañado siempre en la elaboración de esta tesis. Los dos son mis maestros tanto en la práctica médica como en el trabajo científico. Y a los dos debo el placer de ser el Cirujano Infantil que soy. El primero, en la distancia, es el Dr Carlos Jiménez Alvarez; a él he de “culpar” del inicio de mi vocación y la elección, posiblemente la más acertada de mi vida, del Hospital La Paz para formarme. De él empecé a aprender el trato con el niño enfermo, la importancia de la dedicación constante, la pasión por comprender y el método científico en el ámbito experimental.

El segundo por orden cronológico es el Dr Juan Antonio Tovar, director de esta tesis. Su infatigable ánimo de estudio, su permanente disponibilidad, su nivel intelectual y a la vez su cercanía humana, le hacen ser el culpable último de mi vocación científica y asistencial. Su capacidad de trabajo y la calidad de sus decisiones son un ejemplo para cualquier cirujano infantil.

También he de agradecer muy especialmente este trabajo al Dr Juan Antonio Díez Pardo, que falleció durante el desarrollo de los experimentos descritos en la tesis. Su muerte supuso un mazazo para todo el Hospital La Paz, especialmente para los que trabajábamos con él en el Laboratorio de Cirugía Experimental. El vacío de su pérdida, no sólo científica sino principalmente humana, será siempre imposible de llenar.

Quiero también dar las gracias a mi familia. A mis padres, que han hecho posible desde Septiembre de 1968, que yo sea lo que soy. A María, por acompañarme, apoyarme y tapar los huecos que, a diario, he dejado por “trabajar tanto”. Y a mis tres hijos, simplemente por estar ahí; ellos son mi mejor tesis.

Gracias a todos mis compañeros de Departamento, ya sean Jefes, Adjuntos o Residentes, especialmente a estos últimos. Todos ellos me han visto crecer, mejor o peor, como cirujano y como científico. A ellos debo, seguro, gran cantidad de horas robadas a la asistencia para las fugas al laboratorio.

En el ámbito experimental son decenas las personas a las que he de agradecer este trabajo. Los becarios de investigación han sido siempre los más cercanos colaboradores; quiero agradecer especialmente su ayuda a Sandra Montedónico, Salomé González, Virginia Fernández, Rubén Matesanz, Wenceslao Martínez Calonge y Federica Pederiva. Gracias a todo el personal del Laboratorio de I+D del Hospital La Paz, desde los Investigadores hasta el personal de limpieza, con especial cariño a los Celadores encargados del animalario, Pablo y Raul. Y también a las Técnicas de Anatomía Patológica Mera, Petri y Raquel, por su inestimable ayuda en las tinciones y la inmunohistoquímica.

Esta tesis tiene una gran base anatomopatológica. Quiero también dar las gracias a los Dres Emilio Burgos e Ignacio Rodríguez por su apoyo, sus consejos y su ánimo permanente.

Y a todos los que, de alguna manera, han contribuido a la realización de este trabajo.

A María, Inés, Jaime y Leo

SIGLAS UTILIZADAS

A: Anterior

AE: Atresia de esófago

Ao: Aorta

ACD: Arteria carótida derecha

AoA: Aorta ascendente

Aod: Aorta descendente

ASD: Arteria subclavia derecha

BD: Bronquio derecho

BI: Bronquio izquierdo

COUP-TF II: En inglés “*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*”, factor de transcripción II del promotor del gen de la ovoalbúmina de pollo.

D: Derecha.

E: Esófago

ECMO: Oxigenación con membrana extracorpórea

EEl: Esfínter esofágico inferior

EES: Esfínter esofágico superior

FiO₂: Proporción de contenido de oxígeno en la mezcla de gases anestésicos o ventilatorios.

g: gramos

HDC: Hernia diafragmática congénita

HOM: Genes homeóticos

I: Izquierda

MEN: Neoplasia endocrina múltiple

mm: milímetros

mmHg: milímetros de mercurio

NV: Nervio vago

NVD: Nervio vago derecho

NVI: Nervio vago izquierdo

NRLD: Nervio recurrente laríngeo derecho

NRLI: Nervio recurrente laríngeo izquierdo

ON: Oxido nítrico

P: Posterior

PaCO₂: Presión arterial de anhídrido carbónico

PaO₂: Presión arterial de oxígeno

PMA: Presión media de la vía aérea

PMP: Placa mesenquimal posthepática

RGE: Reflujo gastroesofágico

RR: Frecuencia respiratoria

RTEEI: Relaxaciones transitorias del esfínter esofágico inferior

Shh: En inglés “sonic hedgehog”, factor de transcripción.

SP-A y SP-B: Genes responsable de la síntesis de las proteínas A y B del surfactante respectivamente.

T: Tráquea

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo 1.

Tm: Timo

V: Vértebra

JUSTIFICACIÓN **8-10**

INTRODUCCIÓN **11-76**

1.- La hernia diafragmática congénita

1.1.- Epidemiología, genética y malformaciones asociadas.....	11
1.2.- Embriología del diafragma.....	15
1.3.- Histopatología.....	18
1.4.- Diagnóstico.....	19
1.5.- Factores pronósticos	
1.5.1.- Factores anatómicos.....	22
1.5.2.- Parámetros fisiológicos.....	22
1.6.- Tratamiento	
1.6.1.- Tratamiento prenatal.....	23
1.6.2.- Tratamiento preoperatorio	
1.6.2.1.- Reanimación.....	24
1.6.2.2.- Ventilación mecánica.....	25
1.6.2.3.- Vasodilatadores pulmonares.....	26
1.6.2.4.- Surfactante.....	26
1.6.3.- Tratamiento quirúrgico	
1.6.3.1.- Momento del tratamiento.....	26
1.6.3.2.- Técnica quirúrgica.....	27
1.7.- Otros tratamientos y tendencias futuras	
1.7.1.- Oxigenación con membrana extracorpórea.....	29
1.7.2.- Cirugía fetal, ventilación líquida y trasplante pulmonar.....	29
1.8.- Supervivencia.....	31
1.9.- Secuelas a largo plazo	
1.9.1.- Respiratorias.....	31
1.9.2.- Retraso en el crecimiento.....	31
1.9.3.- Déficit neurocognitivo.....	32
1.9.4.- Hipoacusia.....	33
1.9.5.- Deformidades ortopédicas.....	33
1.10.- La hernia diafragmática congénita y el reflujo gastroesofágico.....	34

2.- Fisiopatología del reflujo gastroesofágico	
2.1.- Anatomía y embriología del esófago.....	37
2.2.- Fisiopatología del mecanismo antirreflujo.....	38
2.2.- Control nervioso de la motilidad esofágica.....	40
2.4.- Mecanismos responsables del reflujo gastroesofágico.....	41
2.5.- Importancia del estudio de la innervación esofágica en el RGE.....	44
3.- El modelo experimental de hernia diafragmática congénita.....	45
4.- La cresta neural y el SNE	
4.1.- Concepto.....	49
4.2.- La CN como cuarta hoja germinal.....	52
4.3.- Cresta neural craneal o preótica y troncal o postótica.....	54
4.4.- La cresta neural como origen de los nervios vagos y de las células nerviosas del tubo digestivo.....	54
4.5.- Formación de los ganglios y diferenciación de las neuronas intestinales.	58
5.- Las neurocristopatías	
5.1.- Concepto.....	59
5.2.- Defectos craneofaciales congénitos.....	62
5.3.- Tumores	
5.3.1.- Neuroblastomas.....	62
5.3.2.- Neurofibromas y neurofibromatosis de von Recklinghausen.....	63
5.3.3.- Apudomas.....	64
5.4.- Cardiopatías.....	64
5.5.- Enfermedad de Hirschsprung.....	64
5.6.- La HDC como neurocristopatía.....	65
6.- Mecanismos moleculares y genéticos: relación de la HDC y la CN	
6.1.- Sonic Hedgehog (Shh), Patched (Ptch), Smoothened (Smo), Gli.....	67
6.2.- Genes Hox.....	69
6.3.- Ácido retinoico (AR) y sus receptores (RAR y RXR).....	75

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 77-80

1.- Hipótesis.....	78
2.- Objetivos.....	80

MATERIAL Y METODOS 81-100

1.- Animales.....	82
2.- Procedimiento experimental	
2.1.- Grupos experimentales.....	82
2.2.- Procedimiento	
2.2.1.- Fecundación controlada.....	82
2.2.2.- Administración del teratógeno.....	83
2.2.3.- Cesárea y obtención de los fetos.....	83
2.2.4.- Estudio de la inervación esofágica extrínseca.....	89
2.2.5.- Estudio de la inervación esofágica intrínseca	
2.2.5.1.- Estudio inmunohistoquímico en cortes esofágicos transversales.....	94
2.2.5.2.- Estudio histoquímico en esófagos completos o “whole-mount”.....	96
2.2.5.3.- Evaluación cuantitativa del número de células.....	98
2.2.5.4.- Evaluación semicuantitativa de los plexos nerviosos..	99
3.- Métodos estadísticos.....	99

RESULTADOS 101-156

1.- Inervación esofágica extrínseca: nervios vagos y recurrentes laríneos	
1.1.- Obtención de los embriones, peso y sujetos del estudio.....	102
1.2.- Anatomía de la inervación esofágica extrínseca en el grupo Control.....	103
1.3.- Anatomía de la inervación esofágica extrínseca en el grupo HDC.....	110
1.4.- Reconstrucción tridimensional de los hallazgos anatómicos.....	123

2.- Inervación esofágica intrínseca: estudio inmunohistoquímico en cortes esofágicos transversales	
2.1.- Obtención de los embriones y sujetos del estudio.....	131
2.2.- Descripción de los hallazgos.....	131
3.- Inervación esofágica intrínseca: estudio histoquímico en esófagos completos o “ <i>whole-mount</i> ”	
3.1.- Obtención de los embriones y sujetos del estudio.....	147
3.2.- Descripción de los hallazgos.....	147
3.2.1.- Número de ganglios por campo de gran aumento.....	153
3.2.2.- Número de células por ganglio.....	153
3.2.3.- Área ganglionar relativa.....	154
3.2.4.- Análisis de los datos en las diferentes regiones esofágicas.....	154

DISCUSIÓN

156-180

1.- La CN y la atresia de esófago	
1.1.- Hallazgos morfológicos.....	157
1.2.- Evidencia genética.....	160
2.- La CN y la hernia diafragmática congénita	
2.1.- El mecanismo de acción del nitrofen.....	161
2.2.- El nitrofen y la cresta neural.....	163
3.- El reflujo gastroesofágico como problema en la HDC.....	165
4.- Las alteraciones esofágicas en la HDC.....	167
5.- Las alteraciones vagales en la HDC experimental	
5.1.- Una evidencia más de la malformación neurocristal.....	170
5.2.- Utilidad de la reconstrucción tridimensional en el estudio.....	171
5.3.- Limitaciones del estudio de la inervación esofágica extrínseca.....	172

6.- Las alteraciones en el plexo mientérico en la HDC experimental	
6.1.- Tinción inmunohistoquímica en cortes transversales	
6.1.1.- Idoneidad de la técnica.....	174
6.1.2.- Cuantificación de los hallazgos.....	175
6.2.- Tinción histoquímica en “whole-mount”	
6.2.1.- Idoneidad de la técnica.....	176
6.2.2.- Cuantificación de los hallazgos.....	177
6.3.- Importancia de los hallazgos.....	179

CONCLUSIONES	181-182
---------------------	----------------

BIBLIOGRAFÍA	183-217
---------------------	----------------

Justificación

El reflujo gastroesofágico es una de las secuelas más importantes en los pacientes supervivientes a una hernia diafragmática congénita. Su elevada incidencia, unido a la demostración de determinadas alteraciones anatómicas en el esófago de estos pacientes, sugiere que existen razones anatómicas y funcionales que favorecen el reflujo en esta entidad.

El estudio de la hernia diafragmática en condiciones de laboratorio ha permitido demostrar la similitud del modelo murino y la entidad humana, no sólo en el defecto primario sino, lo que casi es más importante, en todo el cortejo malformativo acompañante. Al mismo tiempo ha facilitado la comprensión de los mecanismos moleculares y genéticos involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad.

Uno de estos mecanismos más verosíblemente afectados es la organogénesis derivada de la cresta neural. Esta estructura embrionaria es el origen de múltiples y muy diferentes células, órganos y sistemas. Hasta la fecha, nuestro grupo y otros han demostrado que muchos de ellos se encuentran alterados tanto en la entidad humana como en el modelo experimental.

El sistema nervioso entérico deriva íntegramente de las células de la cresta neural. Los nervios vagos y todas las neuronas y tejido glial que se encuentran en el espesor de la pared intestinal provienen de unas pocas células neurocristales. Su correcta disposición y funcionamiento aseguran una actividad intestinal normal. Una alteración a nivel esofágico condicionaría una malfunción que podría desembocar, entre otros, en reflujo.

Hasta la fecha no existen estudios de la inervación del esófago ni en pacientes ni en roedores portadores de hernia diafragmática congénita. Este trabajo intenta responder a esta cuestión, es decir, si existen alteraciones en la inervación esofágica en el modelo experimental de hernia diafragmática inducida con nitrofen.

Introducción

1.- LA HERNIA DIAFRAGMATICA CONGENITA

1.1.- EPIDEMIOLOGIA, GENETICA Y MALFORMACIONES ASOCIADAS:

La hernia diafragmática congénita (HDC) es un defecto en la formación del diafragma que afecta a 1 de cada 2000 a 5000 recién nacidos vivos. En una revisión del National Maternity Hospital de Dublín, la incidencia fue de 1 en 2107 recién nacidos vivos en un total de 90000, cifra que se estima realista dada la escasa incidencia de interrupciones voluntarias del embarazo en Irlanda¹. La incidencia en abortos, por otro lado, no está tan clara; aproximadamente un tercio de todos los fetos con HDC se pierden en el curso de la gestación, aunque estas muertes suelen ser debidas a otras malformaciones asociadas letales².

La malformación consiste en un orificio diafragmático situado en la porción posterior y lateral, generalmente en el lado izquierdo, a través del cual pasan al tórax las vísceras abdominales (Figura 1). Éstas pueden incluir el lóbulo hepático izquierdo, el bazo, el páncreas, los riñones y todo el tracto gastrointestinal desde el estómago hasta el colon³. Aproximadamente en el 80% de los casos el defecto es izquierdo, derecho en un 19-20% y, muy raramente, es bilateral. Habitualmente es una malformación esporádica, siendo considerados menos del 2% casos familiares⁴.

Al menos el 10% de los pacientes con HDC y otras malformaciones al nacimiento presentan una asociación sindrómica conocida⁵. En algunos casos el gen responsable es conocido, como algunos síndromes que asocian sobrecrecimiento, tumores embrionarios y HDC (síndromes de Simpson-Golabi-Behmel, Denys-Drash, Beckwith-Wiedemann y Perlman),

u otros en los que los defectos mesenquimales o del tejido conjuntivo pueden causar HDC (síndromes de Marfan y craneofrontonasal y distostosis espondilocostal)⁶.

Otra asociación clásica de malformaciones severas y HDC es el síndrome de Fryns que asocia a la hernia hipoplasia pulmonar, alteraciones en los dedos y uñas, facies tosca, paladar hendido, fisuras faciales, malformaciones cerebrales, cardiopatía, displasia renal y malformaciones genitourinarias, y que es casi invariablemente mortal⁷. Hasta hace poco no se conocía su causa, que parece ser la asociación de dos deleciones en los cromosomas 15 y 8, lo que explicaría su herencia autosómica recesiva⁸.

Se han descrito alteraciones cromosómicas hasta en el 33% de los casos de HDC⁵. Las más frecuentes son las alteraciones en el número de cromosomas, tales como los síndromes de Turner, Down, Edwards y Patau⁶.

En general, el 100% de los fetos autopsiados con HDC y de un 40 a un 57% de los pacientes tienen malformaciones asociadas^{9,10}. Considerando los abortos, mortinatos y recién nacidos, las más frecuentes son defectos derivados del cierre del tubo neural, anomalías cardíacas, genitourinarias, gastrointestinales, esqueléticas, cromosómicas y malformaciones pulmonares¹¹. Son muy frecuentes por tanto los defectos del tubo neural¹², las cardiopatías congénitas con defectos conotruncales principalmente^{13,14}, las malformaciones del esqueleto axial y los miembros¹⁵⁻¹⁷ y la asociación a síndromes derivados de malformaciones de los arcos branquiales¹⁸.

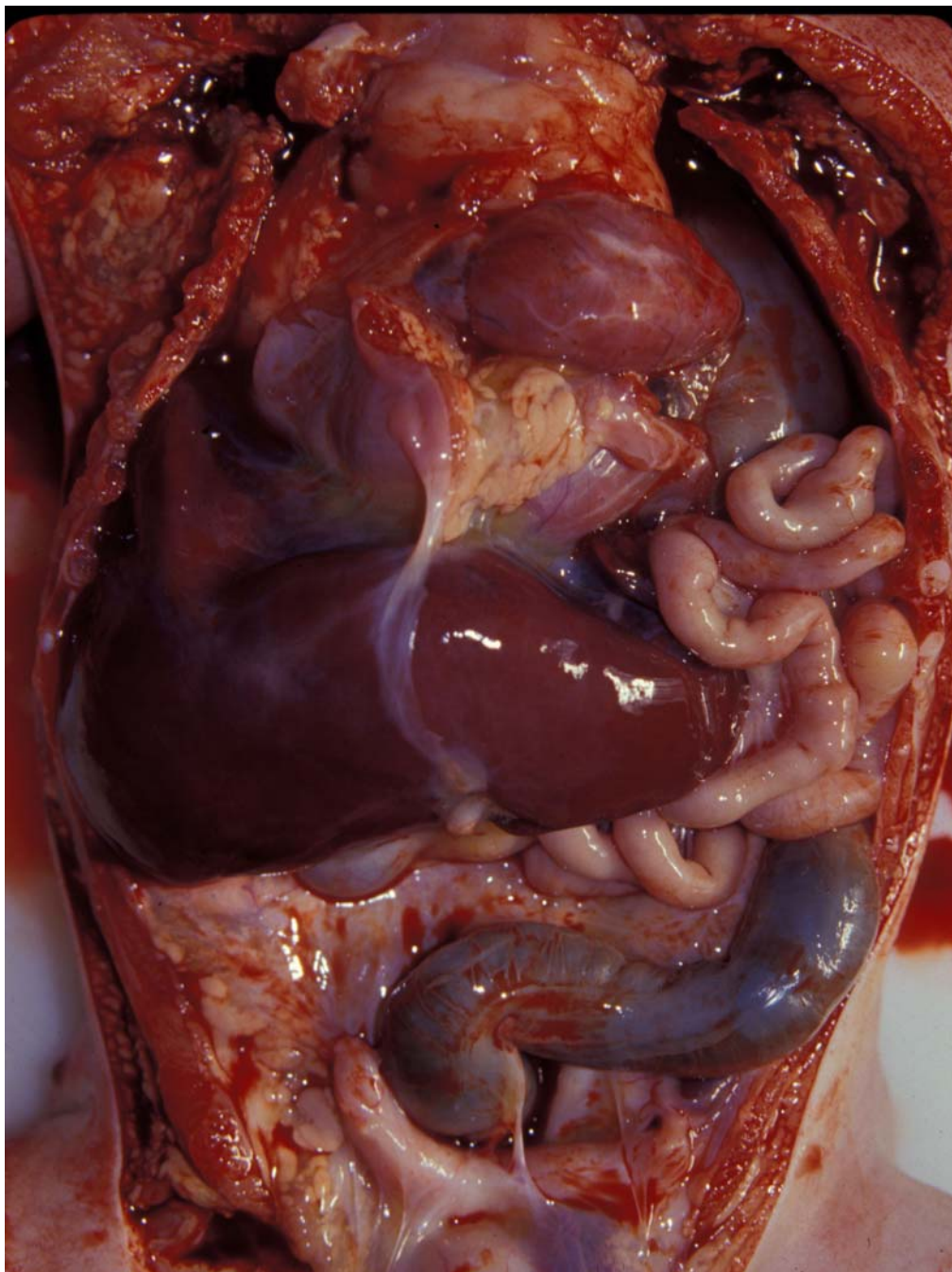


Figura 1: Imagen correspondiente a una necropsia de un recién nacido fallecido a las 2h de vida por presentar una HDC bilateral. Nótese la presencia de intestino en el hemitórax izquierdo y la herniación del lóbulo hepático derecho hacia el tórax del mismo lado.

1.2.- EMBRIOLOGIA DEL DIAFRAGMA:

El desarrollo embriológico del diafragma es un proceso con algunos puntos no aclarados que implica múltiples y complejas interacciones tanto de tejidos como de células. Clásicamente el diafragma se considera derivado de 4 componentes distintos¹⁹:

- 1.- El tendón central anterior que se forma a partir del *septum transversum*. Algunos mioblastos que se originan en él emigran a las membranas pleuroperitoneales arrastrando con ellos las correspondientes ramas de los nervios frénicos. La porción diafragmática originada es la no muscular o centro tendinoso diafragmático.
- 2.- Las porciones dorsolaterales, que se forman a partir de las membranas pleuroperitoneales.
- 3.- Un anillo de mesodermo paraaxial de la pared corporal y que corresponde a los músculos intercostales torácicos de los niveles T7 a T12.
- 4.- Los pilares diafragmáticos, que evolucionan a partir del mesénquima del intestino anterior en los niveles L1 a L3.

En una primera fase, que tiene lugar entre la tercera y la cuarta semana postconcepcional, se desarrolla el llamado primordio diafragmático ²⁰. El diafragma es inicialmente una masa de tejido mesenquimal rodeada por el epitelio de la cavidad pericárdica por arriba y por el de la cavidad peritoneal por abajo; su límite dorsal lo forman los canales

pleuroperitoneales, que ponen en comunicación las cavidades pericárdica y abdominal. Muy pronto crecerán células hepáticas en el *septum transversum*, expandiéndolo en una dirección ventrolateral. Este septum está sujeto ventral y lateralmente a la pared del cuerpo y dorsalmente al mesénquima asociado al intestino anterior. Al final de esta primera fase, el diafragma primitivo está pues compuesto por 2 partes, una ventral que es el *septum transversum* y otra dorsal que son los canales pleuroperitoneales.

La segunda fase del desarrollo diafragmático consiste en el cierre definitivo de los canales pleuroperitoneales al tiempo que se forma la cavidad pleural. Esta fase comprende de la cuarta a la octava semana de vida embrionaria y no está muy claro cómo es el proceso que facilita el cierre de estos canales. En 1984 Iritani propuso la teoría de la existencia de una tercera parte del diafragma, la llamada placa mesenquimal posthepática (PMP)²¹, que estaría alojada entre las otras dos descritas en el párrafo anterior. Su crecimiento lateral y caudal facilitaría el cierre de las membranas pleuroperitoneales. En lo que sí parecen estar de acuerdo todas las teorías es que este cierre se ha completado alrededor de la octava semana de gestación, momento en que el intestino medio se reintroduce en la cavidad peritoneal²⁰

Las membranas pleuroperitoneales se ven entonces invadidas por mioblastos derivados de los somitos cervicales que siguen el camino que les ofrecen los nervios frénicos. La parte diafragmática derivada de la pared, por su parte, será inervada por los nervios intercostales.

Esta muscularización de las membranas es algo más tardía en la porción más posterolateral, región que fue descrita por primera vez por Bochdalek

en 1848, razón por la que el sitio más común para la presentación de una HDC lleva su nombre²¹.

En suma, existen 3 pasos en el desarrollo normal del diafragma y en los que la PMP jugaría un papel fundamental²²:

- 1.- La formación de un sistema de pliegues que logra separar las cavidades pleural y peritoneal,

- 2.- La expansión dorsocaudal del hígado, que actuaría como una fuente de mesénquima para la PMP.

- 3.- El cierre de los canales pleuroperitoneales.

Clásicamente se ha considerado como causa de la HDC la falta de cierre de los canales pleuroperitoneales. Sin embargo sabemos por los estudios experimentales en roedores que esto no es necesariamente así, pues ni el defecto resultante de su falta de cierre es suficientemente grande ni el momento en el que sucede el oportuno para que ocurra la hernia ²⁰. De estos estudios sabemos que el denominador común en la embriología de la HDC es un desarrollo anormal de la PMP.

En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento del control genético de este proceso embrionario. La identificación del gen COUP-TFII como básico para el correcto desarrollo de la PMP, abre algunas puertas a la comprensión de las bases moleculares de la embriología de la HDC²³.

1.3.- HISTOPATOLOGIA:

A pesar de que su causa es desconocida, los efectos de la HDC sobre la función y el desarrollo pulmonar están muy bien descritos. Las vísceras herniadas en la cavidad torácica no siguen su proceso normal de rotación y fijación intraabdominal, por lo que la malrotación es un hallazgo constante en la HDC. De la misma manera, si el cierre del canal pleuroperitoneal tiene lugar aunque sea parcialmente, las vísceras abdominales pueden estar cubiertas por una membrana no muscular que forma una especie de saco herniario hasta en el 10% de los casos²⁴.

El defecto se puede describir como un espacio totalmente abierto entre el tórax y el abdomen, generalmente de unos 4 cm de diámetro en la porción posterolateral izquierda del diafragma. Las vísceras herniadas originan problemas tanto pulmonares como cardíacos, que hoy comprendemos porque han sido reproducidos fielmente en diversos modelos experimentales²⁵. De ellos se sabe que la hipoplasia pulmonar asociada a la HDC y que es el mayor condicionante de la presentación clínica y el pronóstico de los pacientes, forma parte del defecto primario y no es tan solo consecuencia de la compresión de las vísceras abdominales sobre el pulmón^{21,22}.

Una de las características de esta hipoplasia pulmonar es que no sólo afecta al lado donde está la hernia, sino que también el contralateral está alterado. Debido a que el proceso de división bronquial se ve afectado por el defecto primario y la presencia intratorácica de las asas, el desarrollo pulmonar se ve comprometido. De ahí que existan al nacimiento tanto menor número de bronquios como menor cantidad de alveolos en los pulmones de los pacientes con HDC²⁶.

Al mismo tiempo, el lecho vascular también está alterado. Existe una reducción en el número de divisiones arteriales en ambos pulmones y, lo que es más característico, una marcada hiperplasia de la capa muscular media de las arterias²⁷. La consecuencia fisiopatológica de esta hiperplasia es un aumento en la susceptibilidad de sufrir hipertensión pulmonar tras el nacimiento, cuando al no caer las presiones pulmonares se instaura una situación que conocemos como persistencia de circulación fetal. En ella las resistencias pulmonares son altas, el flujo pulmonar es bajo y se establecen desvíos de sangre pulmonar a territorio sistémico, ya sea a través del foramen oval ya a través del ductus arterioso. La presencia de sangre no oxigenada en territorio sistémico condiciona una hipoxia que a su vez, estimula la vasoconstricción pulmonar, cerrando este círculo vicioso que puede acabar con la vida del paciente. Otros factores presentes que pueden acentuar aún más esta vasoconstricción pulmonar son la acidosis, la hipotermia y la situación de estrés a la que está sometido el recién nacido con HDC²⁸.

1.4.- DIAGNOSTICO:

En general, el defecto es diagnosticado semanas antes del nacimiento mediante una ecografía, lo que ocurre en nuestro medio hasta en el 90% de los casos²⁹. La presencia de polihidramnios es frecuente³⁰, atribuida habitualmente a la posición anatómica de la unión gastroesofágica, lo que impediría al feto tragar líquido amniótico. Los signos ecográficos más frecuentes que permiten diagnosticar la HDC son la ausencia de cámara gástrica y la presencia de alguna viscera sólida en el tórax.

Después del nacimiento la sintomatología del niño con HDC es básicamente respiratoria y depende del grado de hipoplasia y de hipertensión pulmonares que acompañan a la malformación.

Habitualmente se trata de un recién nacido con dificultad respiratoria progresiva y severa, abdomen excavado y un hemitórax que puede estar insuflado a medida que las vísceras abdominales se llenan de aire. El diagnóstico es fácilmente confirmado mediante la radiografía simple, sin que sean necesarias la mayoría de las veces otras pruebas (Figura 2). No son necesarias más exploraciones para el diagnóstico de la HDC aunque sí para el despistaje obligado de otras malformaciones asociadas, por lo que son necesarias, al menos, una radiografía del esqueleto, una ecocardiografía, una ecografía abdominal y una ecografía cerebral.

Dada la alta tasa de diagnósticos prenatales, esta sintomatología ocurre raramente, pues al nacimiento (frecuentemente mediante cesárea programada en los centros terciarios) el paciente es intubado selectivamente y trasladado a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.

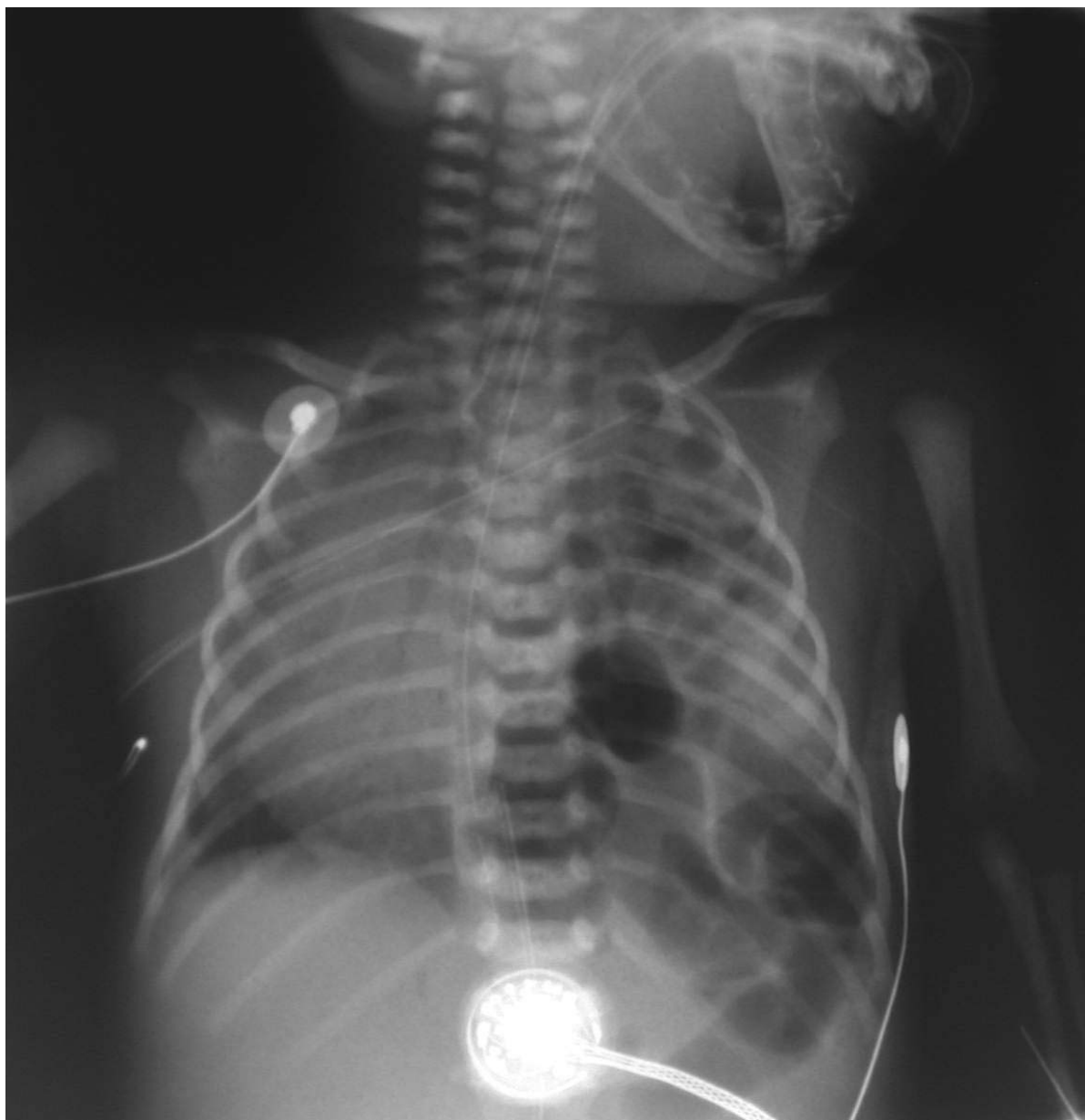


Figura 2: Radiografía simple de tórax de un paciente con hernia diafragmática izquierda donde se aprecia la ocupación del hemitórax por asas intestinales.

1.5.- FACTORES PRONÓSTICOS:

La búsqueda de factores pronósticos asociados a la HDC ha sido históricamente frustrante, compleja y contradictoria, ya que suelen haber sido deducidos desde estudios retrospectivos que sufren el sesgo básico de los avances tecnológicos continuos en el tratamiento de estos pacientes.

1.5.1.- Factores anatómicos:

Algunos autores han sugerido que un diagnóstico prenatal antes de las 24 semanas de gestación sugiere un mal pronóstico³¹, aunque esto no ha sido refrendado por otros³². Tampoco el polihidramnios ha sido considerado unánimemente como un factor pronóstico, existiendo estudios que apoyan o descartan dicha posibilidad^{29,33}, al igual que ocurre con la posición intratorácica del estómago^{34,35}. Otros factores implicados han sido el grado de hipoplasia cardíaca³⁶ (de difícil interpretación pues es explorador-dependiente) y, más recientemente, el cociente resultante de dividir el área pulmonar del lado de la hernia entre el área cerebral^{37,38}. Así, la constatación a las 24 semanas de edad gestacional de un cociente menor de 0,8 junto a la presencia del hígado en la cavidad torácica se asoció a un 100% de mortalidad postnatal³⁹. Este índice, sin embargo, también se ha visto cuestionado como factor pronóstico en las últimas revisiones practicadas⁴⁰.

1.5.2.- Parámetros fisiológicos:

Fueron Boix-Ochoa et al los primeros en publicar que los pacientes con bajas concentraciones de PCO₂ y con PO₂ que mejoraban después de la ventilación mecánica, tenían mejor pronóstico que aquellos con altas

concentraciones de PCO₂ que no respondían a tratamiento médico⁴¹. Desde entonces algunos parámetros utilizados para establecer el pronóstico de estos pacientes han sido el índice de oxigenación ($IO = PMA \times FiO_2 / PaO_2$)⁴², y el de ventilación ($IV = RR \times PMA \times PaCO_2 / 1000$)²⁷, de forma que un IO menor de 0,08 o un IV menor de 40 de 1000 se asocian a una supervivencia mayor del 90%.

1.6.- TRATAMIENTO:

Ya son muy lejanos los tiempos en que se decía que “para el paciente en el que la hernia diafragmática se presenta en el momento de nacer, poco o nada puede hacerse desde el punto de vista quirúrgico”⁴³. Desde entonces el cuidado de estos niños ha mejorado espectacularmente. De hecho, muchas de las innovaciones tecnológicas de las últimas décadas en el tratamiento de los recién nacidos con dificultad respiratoria han surgido gracias a los pacientes con HDC.

1.6.1.- Tratamiento prenatal:

Dado que la mayoría de los casos de HDC se diagnostican prenatalmente, es obligatorio realizar el despistaje de otras malformaciones asociadas, especialmente cardiovasculares y nerviosas, así como realizar un cariotipo mediante una amniocentesis. Además, se debe enviar a la madre a un centro terciario en el que se asegure un correcto tratamiento del recién nacido, evitando un traslado neonatal que, en el mejor de los casos, sería muy peligroso. Otra de las formas de tratar prenatalmente al paciente con HDC es la administración a la madre de glucocorticoides. Derivado de estudios experimentales realizados a mediados de la década de los 90⁴⁴⁻⁴⁸, se supuso que la administración prenatal de dexametasona mejoraba la hipoplasia pulmonar, y podía revertir alguno de los cambios patológicos

que tienen lugar en el pulmón hipoplásico, como por ejemplo la hiperplasia muscular arterial. Algunos estudios de nuestro grupo han demostrado que los corticoides también reducen la hipoplasia cardíaca⁴⁹ y, lo que es más importante, ayudan a mejorar la acción de determinados factores de transcripción implicados en la síntesis del surfactante⁵⁰. Desde entonces el uso de corticoides en la madre gestante de un feto con HDC se convirtió en una política universal; hoy se sabe por estudios prospectivos randomizados que su uso no mejora la supervivencia ⁵¹.

Otros fármacos que han sido probados en el tratamiento prenatal son la hormona liberadora de tirotropina⁵², algunos factores de crecimiento y sustancias antioxidantes⁵³, de las que nuestro grupo también ha demostrado el beneficio de su uso en animales de experimentación y en cultivos de neumocitos humanos⁵⁴⁻⁵⁶.

1.6.2.- Tratamiento preoperatorio:

1.6.2.1.- Reanimación: Todos los esfuerzos deben ir encaminados a estabilizar al paciente y, al mismo tiempo, disminuir el daño iatrogénico. Es esencial tener claro que se trata de una urgencia médica y no quirúrgica. La dificultad respiratoria de estos pacientes viene dada por dos factores: una hipoplasia pulmonar que es irreversible y una hipertensión pulmonar sobre la que se puede actuar.

En primer lugar el paciente debe ser intubado; cualquier intento por ventilarlo con ambú o mascarilla está contraindicado. La monitorización debe ser invasiva, colocando catéteres umbilicales tanto arterial como venoso. La saturación y presión arterial de oxígeno en territorio preductal se hará mediante sensores transcutáneos. La imposibilidad de mantener unas presiones arteriales de oxígeno correctas en territorio preductal

manteniendo una ventilación correcta, se considera un factor de muy mal pronóstico ^{57,58}. Al mismo tiempo se procurará mantener una temperatura adecuada, una perfusión de líquidos correcta, un equilibrio ácido-base estable, un apoyo inotrópico que puede requerir tanto dopamina como dobutamina y, finalmente, una sedación que dependerá básicamente del tipo de ventilación mecánica empleada.

1.6.2.2.- Ventilación mecánica: El objetivo de la ventilación en estos pacientes debe ser mantener una alta frecuencia respiratoria con presiones bajas y, si es posible, sin presión positiva espiratoria. De este modo se deben conseguir buenas presiones de oxígeno preductales con presiones arteriales de CO₂ que pueden oscilar entre 50 y 70 mmHg, e incluso más según la política de hipercapnia permisiva que introdujo hace años el grupo de Stolar de Nueva York⁵⁹. El cambio a otros tipos de ventilación, como la oscilatoria o de alta frecuencia ⁶⁰, se ha usado cada vez más frecuentemente, aunque no está muy claro su impacto individual en la supervivencia de estos pacientes ⁶¹.

1.6.2.3.- Vasodilatadores pulmonares: clásicamente se usó un vasodilatador pulmonar específico llamado Tolazolina para el tratamiento de los pacientes con HDC. Sin embargo su efecto era muy marginal y producía hipotensión y taquifilaxia⁶². Otros agentes que se han intentado incluyen el nitroprusiato, el isoproterenol, la nitroglicerina y el captopril, pero ninguno ha demostrado eficacia ⁶³.

Uno de los más importantes avances de los últimos años ha sido sin duda el uso del óxido nítrico (ON) en el tratamiento ventilatorio de los pacientes con hipertensión pulmonar. Identificado inicialmente como un mediador de la vasodilatación⁶⁴, se trata de un gas de fácil difusión que es rápidamente inactivado cuando se une a la hemoglobina, por lo que se

puede administrar de manera fácil mediante ventilación mecánica y ejerce un efecto solamente local. Su efecto en pacientes con HDC es vasodilatador, y parece existir consenso en el papel jugado por el ON en la mejora del pronóstico de esta patología⁶⁵⁻⁶⁷, aunque no existen evidencias contrastadas mediante ensayos prospectivos randomizados^{68,69}. Curiosamente, esta molécula además juega un papel fisiopatológico indeterminado en la etiopatogenia de la HDC ya que la expresión de la enzima sintetizadora del ON en los vasos pulmonares de los recién nacidos y los animales con HDC está disminuida^{70,71}.

1.6.2.4.- Surfactante: Algunos estudios bioquímicos en pacientes con HDC han demostrado alteraciones en la composición del surfactante⁷², observaciones que se han demostrado también en los modelos animales de esta malformación⁷³⁻⁷⁶. Su uso en clínica está en continua evaluación mediante estudios prospectivos,⁷⁷⁻⁷⁹ que parecen concluir sin embargo que no son beneficiosos en términos de supervivencia^{80,81}.

1.6.3.- Tratamiento quirúrgico:

1.6.3.1- Momento del tratamiento: inicialmente considerada como una emergencia quirúrgica⁸², hoy sabemos que el paciente requiere un periodo de estabilización preoperatorio que permita alcanzar una función respiratoria más adecuada⁸³⁻⁸⁶. De hecho, algunos estudios han demostrado la eficacia del tratamiento quirúrgico diferido en la disminución de las tasas de mortalidad y en la incidencia de persistencia de circulación fetal en los niños con HDC⁸⁷.

¿Cuándo es entonces el momento adecuado para operar al paciente? Desde la instauración de este periodo de estabilización inicial, la cirugía ha ido atrasándose cada vez más. En algunos estudios parece

demostrarse una normalización progresiva de los valores de hipertensión pulmonar medidos mediante ecocardiografía⁸⁸, proponiendo un retraso en la cirugía de entre 100 y 360 horas contabilizadas desde el nacimiento. Se permitiría así que el diámetro de las arterias pulmonares se incrementara y, al mismo tiempo, disminuyera su sensibilidad a los estímulos de la vasoconstricción pulmonar⁸⁹.

1.6.3.2.- Técnica quirúrgica: A través de una incisión subcostal en el lado de la hernia se accede al defecto diafragmático. Las vísceras deben ser desalojadas suavemente de la cavidad torácica sin dañar ningún órgano, especialmente el bazo o el hígado. El defecto diafragmático es expuesto así en su totalidad. En la mayoría de los casos existe un buen rodete diafragmático en la parte anterior del defecto, siendo muy variable el rodete posterior. En el caso más favorable, el orificio se cierra con puntos sueltos de material no reabsorbible. En determinadas ocasiones es necesaria la interposición de una malla sintética que hace las veces de diafragma y que debe sujetarse tanto al rodete anterior como a las costillas también con puntos sueltos de material no reabsorbible^{90,91} (Figura 3). La reparación de la hernia diafragmática también es posible mediante abordaje toracoscópico o laparoscópico, siendo cada vez más frecuente que algunos autores comuniquen su experiencia mediante esta técnica⁹². En los contados casos en los que existe saco herniario, éste debe ser extirpado en su totalidad antes de proceder al cierre del defecto.

La intervención concluye con el cierre de la cavidad abdominal, que debe hacerse sin tensión. Para conseguirlo, en ocasiones es necesario cerrar tan solo la piel, dejando una eventración muscular que se corregirá meses más tarde. Si incluso la piel no puede cerrarse sin tensión, puede interponerse una malla protésica que se irá retirando en el periodo postoperatorio en el transcurso de la primera semana⁹³.

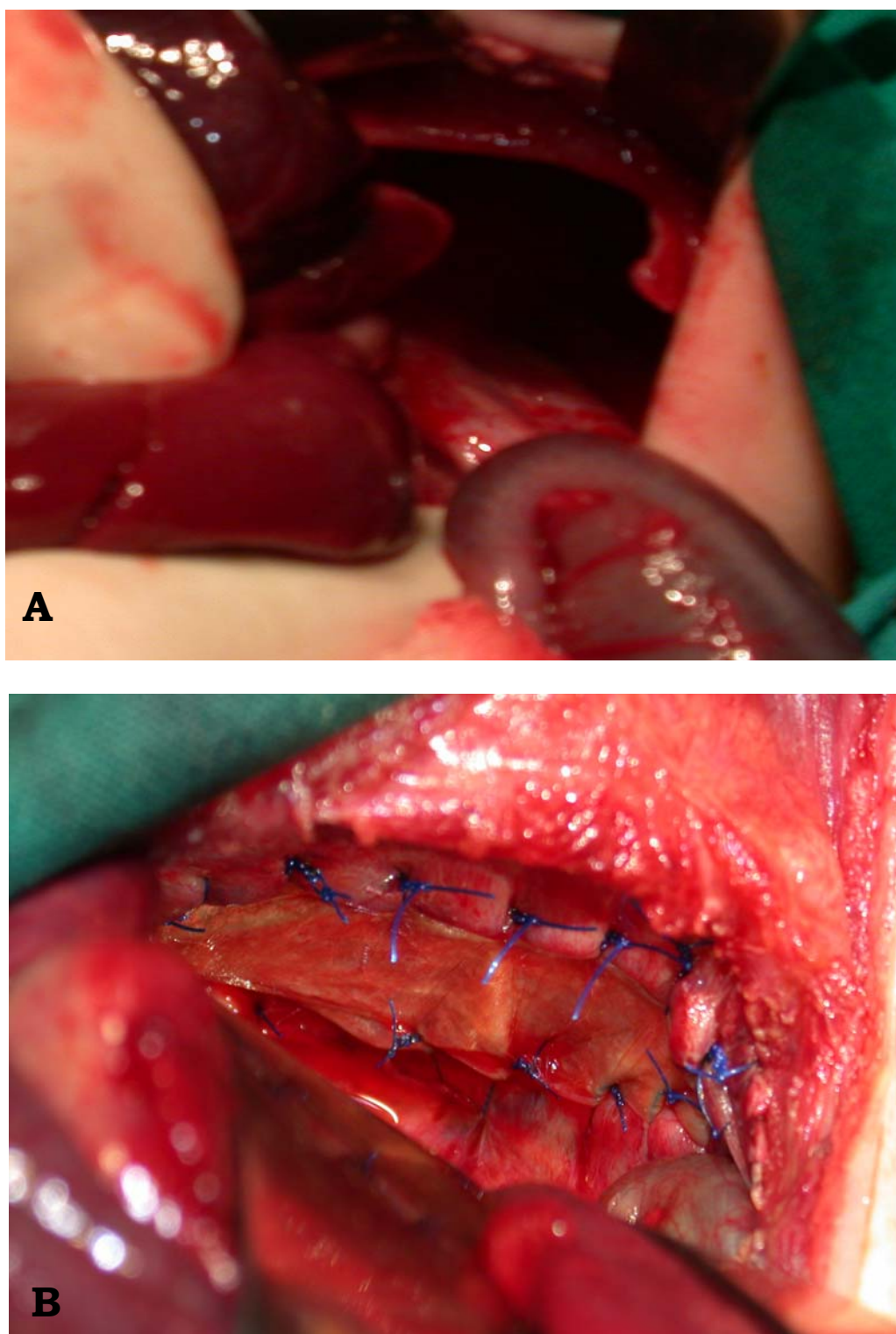


Figura 3: A) Imagen a través de una laparotomía subcostal de un típico defecto de Bochdaleck en el diafragma izquierdo. B) Orificio cerrado mediante la interposición de un parche de material sintético (Goretex®)

1.7. - OTROS TRATAMIENTOS Y TENDENCIAS FUTURAS:

1.7.1.- Oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO):

El ECMO fue introducido en 1977 para tratar recién nacidos con fallo respiratorio refractario a tratamiento convencional. La primera vez que se usó en un paciente con HDC fue en 1981⁹⁴. Considerado como el último escalón en el tratamiento de la insuficiencia respiratoria, su uso ha sido ampliamente difundido para la HDC en aquellos casos en los que las terapias convencionales han fracasado. Sin embargo, sus efectos sobre la supervivencia global y el pronóstico funcional de los pacientes a largo plazo no están del todo claros⁹⁵⁻¹⁰², pues no existen estudios prospectivos ni revisiones sistemáticas que puedan dilucidar su utilidad. Al mismo tiempo, las secuelas de los supervivientes relativas al uso de ECMO son frecuentes. Se ha demostrado que el porcentaje de pacientes sometidos a ECMO con secuelas neurosensoriales era del 40-60% en la HDC y tan solo del 10% en las demás indicaciones de la técnica^{103,104}. Estos y otros estudios^{105,106} no hacen sino aumentar las dudas sobre la eficacia de esta técnica terapéutica.

1.7.2.- Cirugía fetal, ventilación líquida y trasplante pulmonar:

Quizás la modalidad con más impacto mediático en el tratamiento de la HDC es la posible instauración de medidas intraútero para la corrección del defecto o de sus consecuencias. Tras unos intentos iniciales de cerrar el defecto diafragmático¹⁰⁷ que fueron infructuosos, se recurrió a una idea tomada de observaciones experimentales que demostraban un crecimiento pulmonar acelerado después de la oclusión o de la ligadura de la tráquea *in utero*¹⁰⁸⁻¹¹². La oclusión traqueal experimental (llamada en inglés

mediante el acrónimo PLUG por “*plug the lung until it grows*”, en el que “*plug*” además significa literalmente “tapón”) provoca en los animales con HDC una mejor oxigenación y ventilación tras el nacimiento cuando se comparan a los controles no tratados¹¹³. Aunque no es una técnica universalmente extendida, hay en marcha algunos estudios multicéntricos prospectivos para su uso en clínica humana^{39,114}. Todos los ensayos propuestos hasta la fecha coinciden en la necesidad de una identificación muy clara de los pacientes que pueden ser sometidos a esta terapia. Tanto en el modelo europeo como en el americano, los criterios de inclusión pasaban por la identificación de aquellos pacientes con ninguna o casi ninguna posibilidad de sobrevivir tras el nacimiento. En ambos casos se usaron factores pronósticos relativos al cociente entre el área pulmonar y el área cerebral medidas antes de las 24 semanas de edad gestacional.

La ventilación líquida también ha visto cómo su aplicación clínica se hace cada vez más real¹¹⁵⁻¹¹⁸. La administración de perfluorocarbono a los pacientes con HDC aumenta la PaO₂, disminuye la PaCO₂ y aumenta la distensibilidad pulmonar, mejorando el pronóstico de los pacientes con HDC¹¹⁹. El único ensayo clínico publicado hasta la fecha incluyó 13 pacientes, 8 ventilados con perfluorocarbono y 5 con ventilación convencional, todos en ECMO; los 2 grupos mostraron cifras similares de supervivencia¹¹⁸.

Por último, otra terapia que puede tener importancia futura es el trasplante pulmonar auxiliar como paso intermedio que permita la mejora de la hipoplasia pulmonar en estos pacientes^{115,120,121}.

1.8.- SUPERVIVENCIA

A pesar de todos los avances terapéuticos expuestos hasta ahora, la mortalidad de los pacientes con HDC es aún altísima. Se estima que las cifras de supervivencia no alcanzan el 60% en la mayoría de los centros experimentados^{33,122,123}. En cualquier caso, las cifras son muy variables entre centros aparentemente similares, lo que puede implicar tanto diferentes estrategias de tratamiento como distintas políticas de admisión de enfermos. En un estudio multicéntrico relativamente reciente, las cifras de supervivencia en hospitales de Estados Unidos eran de apenas el 69%¹²⁴. Sin embargo otro estudio aislado del Hospital de Niños de Boston la estima en el 93%, cifras que son referidas a un grupo reducido de enfermos y que, por tanto, pueden tener sesgos de reclutamiento¹²⁵. En la experiencia del Hospital Infantil La Paz, la supervivencia global desde la aplicación de técnicas ventilatorias y cardiovasculares avanzadas, es del 65%.

Cuando se toman en consideración datos poblacionales, es decir, cuando se incluyen datos de abortos espontáneos o interrumpidos voluntariamente y datos de pacientes recién nacidos con HDC, las cifras de supervivencia reales alcanzan apenas el 40%, cifra mucho más real que expresa de manera más fiel la gravedad de esta patología¹²⁶⁻¹²⁸.

1.9.- SECUELAS A LARGO PLAZO:

1.9.1.- Respiratorias:

Algunos estudios han demostrado tanto un crecimiento en el número de acinos y alveolos (aunque nunca hasta un número normal) como una mejoría en los parámetros respiratorios medidos mediante espirometría

incentivada, aunque existe un componente restrictivo que no desaparece en el resto de la vida¹²⁹. Para algunos autores gran parte de los supervivientes llevan una vida normal desde el punto de vista respiratorio¹⁰⁴. Sin embargo, la mayoría de las series estudiadas a largo plazo muestran que entre el 48 y el 60% de los pacientes con HDC sufren secuelas pulmonares a largo plazo, a veces tan solo en medidas con espirometría y no percibidas como limitaciones por los pacientes¹³⁰⁻¹³². Lo que sí parece claro es que las secuelas respiratorias son más graves en los pacientes que requirieron más terapia intensiva en el periodo neonatal, especialmente aquellos que requirieron ECMO y corrección del defecto con parche^{130,131,133-135}.

1.9.2.- Retraso en el crecimiento:

Se considera consecuencia de varios factores como la hipoplasia pulmonar, la dificultad respiratoria, el reflujo gastroesofágico y la aversión a la alimentación oral¹³⁶. Su incidencia es tal que hasta la mitad de los pacientes con HDC se encuentran por debajo del percentil 25 de peso y talla durante el primer año de vida¹³⁷. Otros autores elevan este porcentaje hasta el 40% a los 2 años de vida en aquellos que necesitaron ECMO¹³⁸.

1.9.3.- Déficit neurocognitivo:

Aunque algunos de los déficits neurológicos descritos en la HDC pueden ser debidos a la enfermedad de base o sus asociaciones, las secuelas neurológicas se han estudiado de manera especial en pacientes que han tenido un tratamiento con ECMO en el periodo neonatal. Su incidencia oscila entre el 10 y el 50% de los pacientes¹³⁹⁻¹⁴², significativamente mayor que en los sometidos a ECMO por otras patologías^{143,144}.

1.9.4.- Hipoacusia:

La sordera progresiva y más o menos severa es una secuela frecuente y conocida en los pacientes supervivientes de HDC^{103,145,146}. Clásicamente se achacó a los efectos secundarios de los tratamientos neonatales, pero la escasa incidencia de hipoacusia en otros enfermos sin hernia tratados de manera similar y la no asociación al ECMO como factor de riesgo¹⁴⁷, hacen pensar que se trata de una manifestación más de la enfermedad.

1.9.5.- Deformidades ortopédicas:

Su incidencia no está bien calculada, pues hacen falta estudios que prolonguen el seguimiento hasta la época final del crecimiento. Las secuelas más frecuentes son la asimetría torácica, la deformidad costal y esternal y la escoliosis¹³⁶. No suele ser necesaria la corrección quirúrgica, pero sí un seguimiento estrecho especialmente en los casos de escoliosis que asocien patrones respiratorios restrictivos, pues éstos pueden agravarse con la deformidad^{145,148}.

1.10.- LA HDC Y EL REFLUJO GASTROESOFAGICO:

El reflujo gastroesofágico (RGE) es una de las secuelas más frecuentes en los supervivientes de HDC, pues afecta del 45 al 89% de ellos¹⁴⁹⁻¹⁵⁵. Es curioso que, a pesar de esta elevadísima incidencia, no se le prestara demasiada atención hasta finales de los años 80. Hoy se sabe que más de la mitad de los sobrevivientes que llegan a la vida adulta presentan evidencia endoscópica o histológica de esofagitis¹⁵⁵.

A pesar de su frecuencia, su fisiopatología es desconocida. La mayoría de las teorías que intentan explicarlo esgrimen causas anatómicas que tienen que ver con la posición del intestino durante la vida embrionaria y fetal o con la corrección quirúrgica del defecto¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Así, una obstrucción parcial o total de la unión esófago-gástrica debida a la posición intratorácica del intestino, causaría dilatación y acortamiento del esófago, alteraciones en su motilidad, rectificación del ángulo de His y, como consecuencia, RGE^{153,154}. La ausencia de diafragma o la necesidad de uso de parche protésico para la reparación de la hernia también se ha esgrimido como causa favorecedora de reflujo¹³⁷.

Otros factores anatómicos asociados a una mayor incidencia de RGE han sido la presencia del estómago dentro del tórax, la existencia de saco herniario, la herniación del lóbulo hepático izquierdo y el tamaño del defecto¹⁵³, aunque no todos los autores están de acuerdo¹⁴⁹.

Por último, otras causas anatómicas que podrían explicar el reflujo serían el aumento de presión abdominal tras un cierre quirúrgico a tensión¹⁵⁴ y la existencia de un gradiente de presión positivo entre el tórax y el abdomen en estos pacientes¹⁵⁹.

Sin embargo, una observación de Stolar¹⁵⁰ en el año 1988 describiendo una dilatación del tercio inferior del esófago en algunos pacientes operados por HDC fue la primera que sugirió la presencia de una alteración anatómica o funcional en el esófago asociada a la hernia.

La confirmación de estos hallazgos por otros autores^{157,160} y por observaciones propias (Figura 4), además de la descripción de alteraciones funcionales medidas mediante manometría¹⁶¹, hacen pensar que la causa del reflujo en estos pacientes no sea tan sólo posicional sino que se sumen alteraciones en la anatomía esofágica que produzcan malfunción peristáltica a este nivel.

Una anomalía en las células nerviosas encargadas de la motilidad esofágica (plexos mientérico y submucoso) o de las capas musculares estriada o lisa que obedecen sus órdenes, podría producir dilatación, aperistalsis y, por tanto, reflujo. Para una justificación más fundada, analizamos en el apartado siguiente la etiopatogenia y la importancia de la innervación esofágica en la fisiopatología del RGE.

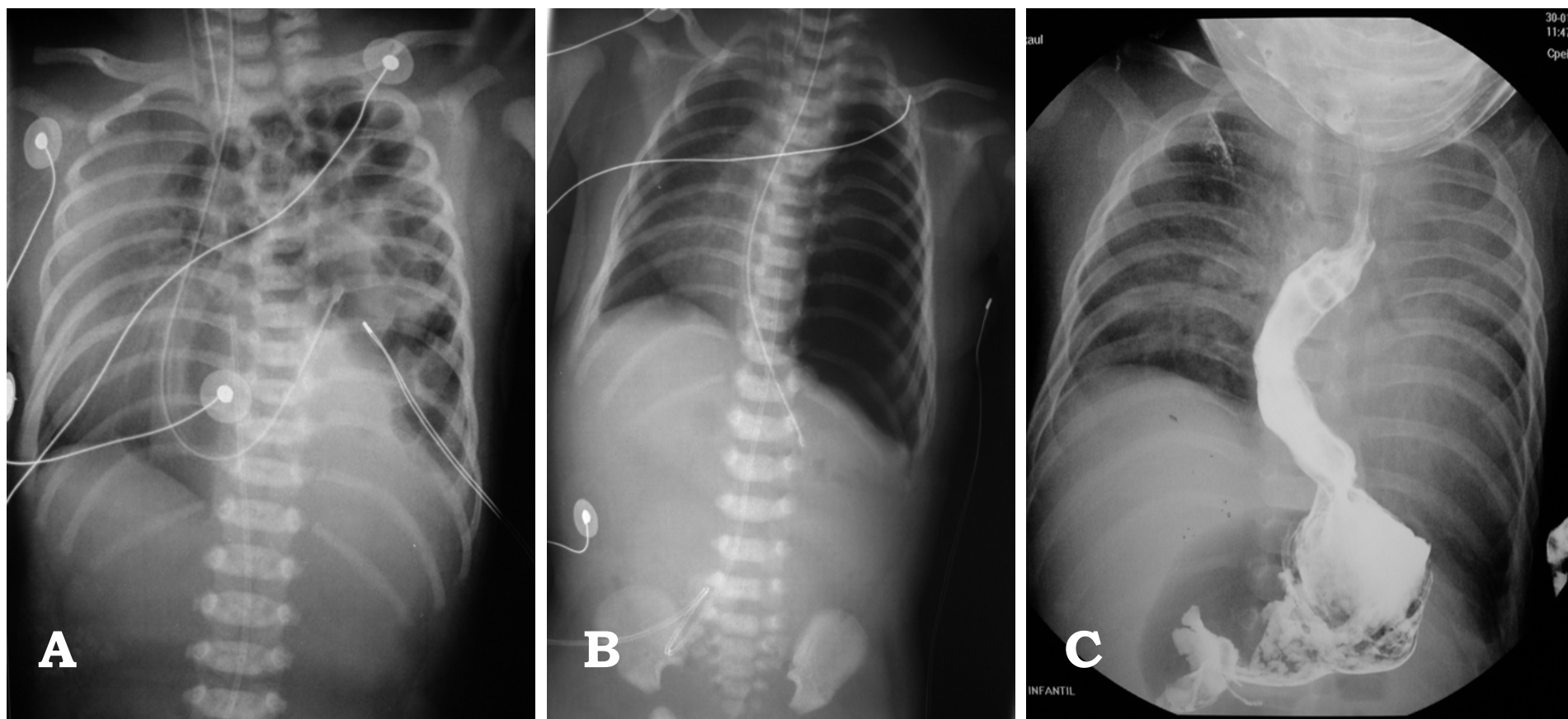


Figura 4: Tres imágenes correspondientes a un paciente tratado en el Hospital La Paz en Noviembre del año 2003 por una HDC izquierda con herniación de todo el intestino incluido el estómago e hipoplasia pulmonar severa (A). Después de su corrección (B) se efectuó un tránsito digestivo superior por sospecha de reflujo gastroesofágico severo, encontrándose además una dilatación severa del esófago desde su tercio medio (C).

2.- FISIOPATOLOGIA DEL REFLUJO GASTROESOFAGICO

2.1.- EMBRIOLOGÍA Y ANATOMIA DEL ESÓFAGO:

El esófago aparece por vez primera cuando el embrión mide apenas 3 mm de longitud, es decir, cuando han pasado 22 ó 23 días desde la fecundación. En este momento el intestino anterior se divide en 2 esbozos: uno anterior que dará lugar a la vía respiratoria y otro dorsal que originará el tubo digestivo. Unas 2 semanas más tarde, es decir, a los 36 días de edad postconcepcional ocurre la división definitiva del árbol respiratorio y el tubo digestivo. El progresivo crecimiento del esófago hará que se alcance su longitud total hacia la séptima semana de gestación¹⁹.

Anatómicamente, el esófago de un recién nacido mide aproximadamente 10 cm desde el cartílago cricoides hasta la unión gastroesofágica. Histológicamente está compuesto por varias capas que, de fuera adentro son: muscular longitudinal (el esófago no tiene capa serosa), muscular circular, submucosa y mucosa.

El extremo esofágico superior está cerrado por una estructura muscular estriada conocida como esfínter esofágico superior, y que no es sino una agrupación de fibras musculares de los músculos cricofaríngeo y tirofaríngeo. Desde el tercio esofágico medio, estas fibras se convierten en una capa interna circular y otra más externa longitudinal, ya de fibras musculares lisas. Al final del esófago, un engrosamiento de estas fibras y su unión con otras provenientes del estómago, formarán el llamado esfínter esofágico inferior.

La innervación esofágica depende de fibras simpáticas (que provienen de los troncos simpáticos torácicos y del plexo celíaco) y parasimpáticas (provenientes de los nervios vagos y de los recurrentes laríngeos, que se encargan del tercio esofágico superior). La innervación esofágica parasimpática proviene de las neuronas preganglionares del nervio vago, que se unen a las neuronas postganglionares del plexo mientérico. Por su parte, las fibras simpáticas provienen de los nervios dorsales T5 a T10 y de sus ganglios paravertebrales correspondientes. Dentro del esófago, los plexos mientérico y submucoso están íntimamente conectados por fascículos intergangliónicos.

Las células ganglionares del plexo mientérico esofágico se encuentran inmediatamente por fuera de la capa muscular circular, y ya son visibles hacia el final de la sexta semana de gestación. Desde estas células se formará a su vez el plexo nervioso submucoso esofágico, que aparecerá sobre el cuarto mes de gestación. A partir de aquí se desarrollan los distintos tipos neuronales y maduran las conexiones interganglionares que harán posible la función esofágica normal¹⁶².

2.2.- FISILOGIA DEL MECANISMO ANTIREFLUJO:

El orificio hiatal diafragmático es una abertura elíptica a través de la cual el esófago y los nervios vagos entran al abdomen. Este orificio está formado a costa de los pilares diafragmáticos, especialmente el derecho, que se originan en el ligamento longitudinal anterior a nivel de las primeras vértebras lumbares, y suben desde ahí para formar el hiato esofágico. En condiciones normales, el esófago pasa a su través anclado por los llamados ligamentos frenoesofágicos, formando así una barrera que impide al estómago subir hacia el tórax¹⁶².

Estas relaciones anatómicas del esófago distal, el hiato diafragmático y el estómago, cambian cuando se inicia la deglución. Fisiológicamente, la peristalsis esofágica es una contracción secuencial de las fibras longitudinales y circulares de la pared que hace progresar el bolo alimenticio. Esta contracción ocurre como media una vez por minuto y siempre en la misma dirección, de manera que aunque comamos boca abajo el bolo alimenticio siempre llegará al estómago¹⁶³.

Intuitivamente es fácil deducir que debe existir, además, un mecanismo que evite el paso del contenido gástrico desde el estómago al esófago. Ya el siglo pasado se demostró su existencia por la descripción primero de una zona de alta presión a ese nivel ¹⁶⁴ y, después, por la prueba de la contribución del diafragma a este mecanismo valvular ¹⁶⁵. Hoy sabemos que en este mecanismo antirreflujo intervienen varios factores que, sumados, impiden el movimiento retrógrado de contenido gástrico:

- 1.- La función propulsora anterógrada del esófago, que impulsa el bolo alimenticio en un movimiento coordinado de contracción proximal y relajación distal, de manera que siempre progresa en el mismo sentido.

- 2.- La unión gastroesofágica, cuyo complejo mecanismo valvular que hace esto posible es el llamado esfínter esofágico inferior (EEI), una porción de unos 2 cm de longitud de músculo liso que integra la última porción esofágica y los primeros milímetros de estómago.

3.- Los pilares diafragmáticos, cuyas fibras musculares estriadas contribuyen al aumento de tono del EEI, sirviendo en esencia como un refuerzo esfinteriano más¹⁶⁶.

2.3.- CONTROL NERVIOSO DE LA MOTILIDAD ESOFAGICA:

El funcionamiento de este complejo antirreflujo es el resultado de la conjunción de un mecanismo neurogénico y otro miogénico, que en los humanos son, respectivamente, la innervación colinérgica y el tono muscular de la fibra lisa dependiente de la concentración intracelular de calcio. Los mecanismos nerviosos que regulan tanto el movimiento peristáltico del esófago desde el nivel faríngeo como el tono del EEI, son mediados de forma casi exclusiva por el nervio vago (NV).

Tras el inicio de la deglución y después de un movimiento que implica numerosos músculos estriados innervados por los pares craneales V, VII, IX, X, XI y XII, el bolo alimenticio alcanza una zona bajo la faringe conocida como el esfínter esofágico superior (EES). El EES está ya innervado exclusivamente por fibras vagales. Estímulos como la distensión esofágica o la inyección de ácido, aumentan su tono muscular, mientras que otros como la deglución, la rumiación, el vómito o la regurgitación lo disminuyen.

Más abajo, la innervación del EEI también depende en exclusiva del NV. De esta manera, la relajación del EEI que sigue a una deglución se inicia en el sistema nervioso central a nivel del núcleo motor del NV (Figura 5). Esta orden viaja a través de las fibras nerviosas vía NV (neurona presináptica) hasta las neuronas del plexo mientérico, que se encargan a través de la neurona postsináptica de transmitir la orden a las fibras musculares. En la sinapsis entre las fibras del NV y

el plexo mientérico intervienen neurotransmisores colinérgicos, mientras que los postsinápticos son no colinérgicos y no adrenérgicos.

Al mismo tiempo, el tono muscular diafragmático se mantiene gracias a las terminaciones de los nervios frénicos, que voluntaria e involuntariamente mueven el diafragma durante los movimientos respiratorios. Curiosamente, los pilares se contraen una fracción de segundo más tarde que las otras porciones diafragmáticas, lo que puede tener un papel importante en la prevención del reflujo¹⁶².

2.4.- MECANISMOS RESPONSABLES DEL RGE:

a) La relajación del EEI: El RGE ocurre cuando el EEI no es capaz de cumplir su función porque su tono muscular está disminuido. Esta hipotonía puede ocurrir de manera aislada, lo que se conoce como relajación transitoria del EEI (RTEEI), o bien ser el resultado de relajaciones inducidas por la deglución que no se acompañan de una peristalsis efectiva. Las RTEEI son el mecanismo más importante en la etiología del RGE en los sujetos normales y en los pacientes con enfermedad por reflujo¹⁶⁷, tanto adultos como niños ¹⁶⁸. En ellos, los episodios de reflujo se atribuyen tanto a una mayor frecuencia de RTEEI como a una mayor incidencia de reflujo durante las RTEEI¹⁶².

Fisiológicamente los estímulos que modulan las RTEEI son múltiples. Ocurren por ejemplo tras distensión gástrica, intubación orotraqueal o sondaje nasogástrico, mientras que se inhiben durante el sueño, la anestesia o las situaciones de estrés importante.

La mediación nerviosa que regula las RTEEI es de nuevo de origen vagal. Se supone que el reflejo vagal es desencadenado por una distensión gástrica o por una estimulación faríngea. Este estímulo debe procesarse a nivel central en algún lugar no determinado, desencadenando una orden mediada por los núcleos vagal y frénico que, a través de la neurona presináptica, transmiten al plexo mientérico o al tejido nervioso diafragmático respectivamente, la orden de relajación del EEI.

b) La alteración de la motilidad esofágica: También se puede sumar al mecanismo responsable del RGE una alteración de la motilidad esofágica. Los estudios de manometría y la radiología demuestran que los pacientes con esofagitis tienen una actividad peristáltica deficiente consistente en una proporción disminuida de ondas primarias que además son débiles, un tránsito enlentecido y un aclaramiento ácido prolongado¹⁶⁹⁻¹⁷². El uso de técnicas de manometría esofágica ambulatoria combinadas con la pH-metría, han permitido conocer además que el RGE altera la respuesta peristáltica a la exposición ácida y que, si se suma la presencia de esofagitis, esta respuesta está gravemente alterada¹⁷³.

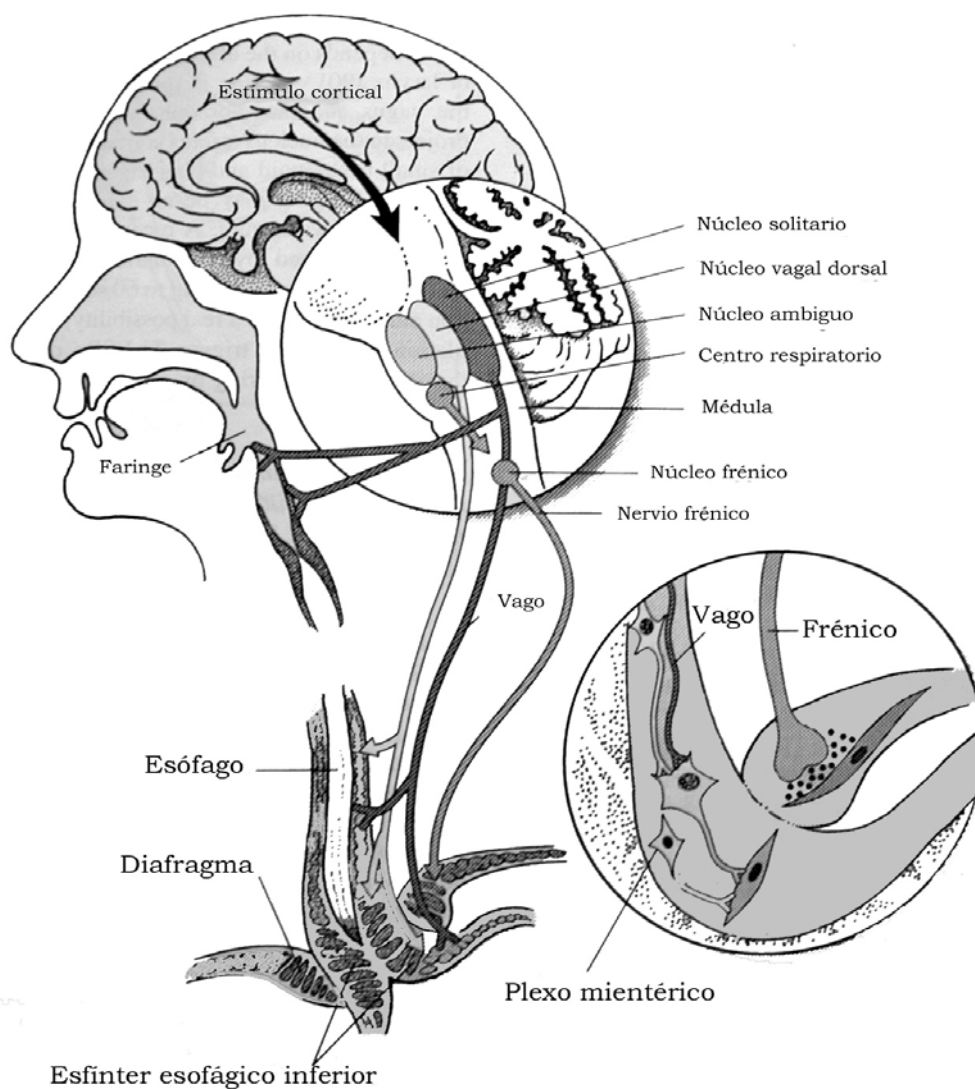


Figura 5: Representación esquemática del camino neural desde el SNC hasta el esófago y el diafragma. El estímulo cortical mediado a través de los núcleos de los pares craneales, desencadena una respuesta motora coordinada en toda la longitud del esófago mediada a través de las neuronas del plexo mientérico que estimulan o inhiben la contracción de las fibras musculares de la pared (Modificado de Mittal RK, N Engl J Med 1997, 336:924).

2.4.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA INERVACION ESOFAGICA EN EL RGE:

Como hemos detallado anteriormente, la inervación vagal mediada por el plexo mientérico es responsable tanto de la propulsión eficaz del bolo alimenticio a través del esófago, como del correcto funcionamiento del mecanismo antirreflujo presente en la unión gastroesofágica.

Una confirmación directa de estas afirmaciones la encontramos en la atresia de esófago (AE). En esta enfermedad la incidencia de RGE es muy alta y su estudio patogénico está muy avanzado. Pues bien, en ella están descritas tanto experimentalmente como en clínica, alteraciones en los vagos y en el plexo mientérico que demuestran una inervación esofágica deficiente¹⁷⁴⁻¹⁷⁸. Es más, la AE y la HDC comparten, tanto en el campo experimental como en clínica humana, varias manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos, en gran medida en células, órganos y sistemas derivados de la cresta neural.

Tanto la inervación esofágica vagal como todo el tejido nervioso que forma el plexo mientérico derivan de las células de la cresta neural. Como hemos dicho más atrás, muchas malformaciones asociadas a la HDC tienen que ver con una organogénesis anormal de esta estructura embrionaria. Desde 1984 disponemos de un modelo animal que reproduce en condiciones controladas de laboratorio, la HDC y sus malformaciones asociadas. En el apartado siguiente haremos un breve resumen de lo que ha supuesto este modelo en el conocimiento de la etiopatogenia de la HDC, y de cómo ha contribuido al esclarecimiento de los mecanismos responsables de la malformación.

3.- EL MODELO EXPERIMENTAL DE HDC

En 1984, Iritani ²¹ comunicó un modelo experimental de HDC por exposición prenatal del embrión de rata a un herbicida llamado nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter) (Figura 6). El modelo consiste en la reproducción de la malformación humana administrando a la madre gestante una cierta cantidad de este herbicida en un momento concreto de la gestación.

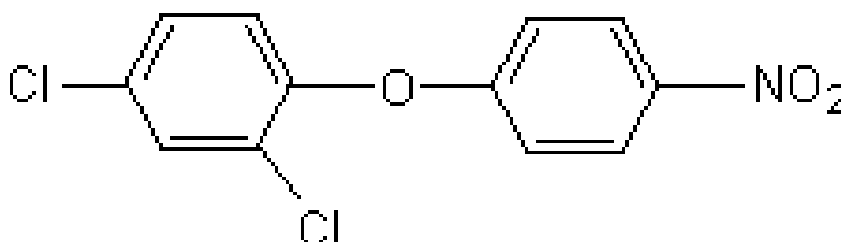


Figura 6: representación de la estructura química del nitrofen

La evolución posterior de este modelo ha demostrado semejanzas de las lesiones obtenidas con las humanas. En efecto, no sólo el defecto diafragmático y la hipoplasia pulmonar son las mismas (Figura 7), sino que las bases patológicas son iguales. De hecho, tanto los hallazgos anatomopatológicos pulmonares como la composición del surfactante son superponibles a las encontradas en el humano¹⁷⁹⁻¹⁸³.

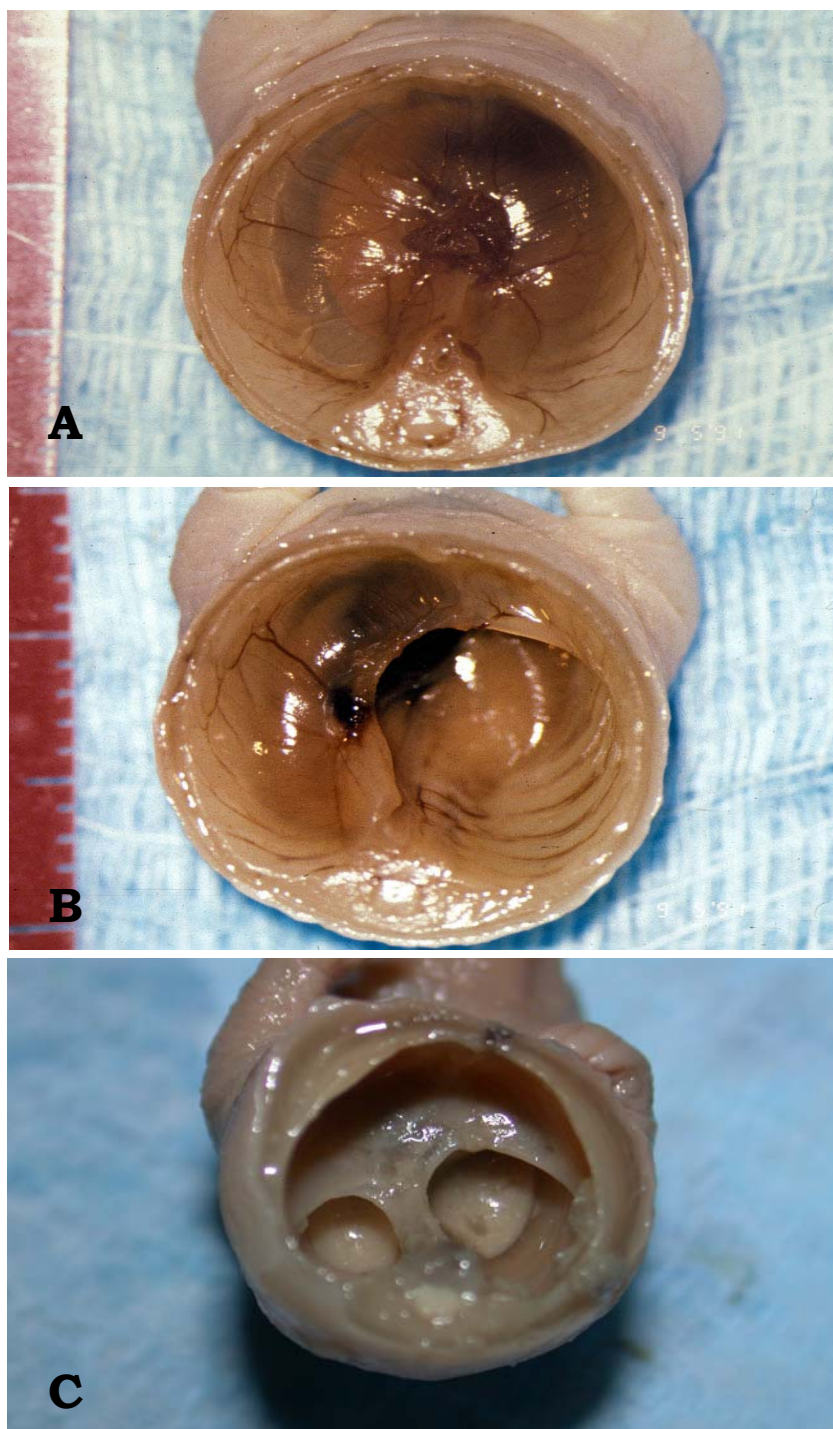


Figura 7: Cortes abdominales transversales en fetos de rata obtenidos en el día 21 de gestación en los que se extirparon todas las vísceras abdominales. A) Feto control con diafragma íntegro. B) Feto con HDC izquierda. C) Feto con HDC bilateral.

Además, varias de las modalidades terapéuticas que se emplean en los pacientes con HDC (incluidas la ventilación de alta frecuencia, la ventilación líquida y el tratamiento prenatal con dexametasona), también se han probado en el modelo experimental, siendo éste un banco de pruebas excelente para el ensayo de nuevos tratamientos^{53,54,184-190}.

Se ha avanzado mucho en la comprensión del mecanismo de acción del nitrofen en la rata. Se sabe que el factor de transcripción TTF-1 está involucrado en el desarrollo pulmonar regulando la expresión y síntesis de las proteínas del surfactante y que se expresa de manera anormal en los pulmones de los fetos de ratas expuestas a nitrofen^{191,192}.

En estudios hechos tanto *in vivo* como en cultivos celulares, nuestro grupo demostró que el nitrofen regula a la baja la expresión de TTF-1, por lo que la hipoplasia pulmonar se debe, más que a un efecto de compresión de las vísceras dentro del tórax, a un defecto primario causado directamente por el herbicida. Es más, la dexametasona parece revertir estos efectos, pues administrada precozmente a las ratas expuestas a nitrofen hace que tanto la expresión de TTF-1 como la cantidad de proteína SP-B del surfactante retornan a cifras similares al grupo control¹⁹³.

Desde el punto de vista molecular, parece demostrado que la acción del nitrofen se ejerce a través de un complejo proceso de oxidación celular, lo que ha abierto una nueva línea de investigación para el uso de sustancias antioxidantes en el tratamiento prenatal de la HDC^{53,54,184,194,195}.

Una de las grandes ventajas que aporta el modelo experimental es que las malformaciones asociadas a la HDC de los fetos tratados con nitrofen son las mismas que aparecen en los humanos. Así, los defectos cardiovasculares que sufren los pacientes con hernia diafragmática también son vistos en los fetos tratados con nitrofen¹⁴, lo mismo que ocurre con la hipoplasia cardíaca¹⁹⁶, las malformaciones esqueléticas¹⁹⁷, el árbol traqueobronquial¹⁹⁸, el riñón¹⁹⁹, los huesos de cara y cráneo²⁰⁰ o las estructuras branquiales como el tiroides, las paratiroides o el timo²⁰¹, malformaciones la mayoría de ellas en las que nuestro grupo de investigación ha sido pionero.

Analizadas una por una, casi todas ellas coinciden con el patrón previsto para las alteraciones de la organogénesis mediada por la cresta neural: los defectos cardíacos (superponibles a los del humano y casi todas anomalías conotruncales y de los grandes vasos), las alteraciones de los huesos de la cara, las malformaciones de las glándulas cervicales o las esqueléticas.

Por esta razón, y dado que existen en el humano evidencias de posibles alteraciones de la inervación esofágica en los pacientes con HDC, nos preguntamos si en el modelo experimental aparecen anomalías estructurales tanto de la inervación esofágica extrínseca (nervios vago y recurrente laríngeo) como de la intrínseca (plexos mientérico y submucoso), ambas dependientes directamente de la migración normal de las células neurocristales.

En el capítulo siguiente analizamos de forma breve cuál es el papel de la cresta neural en la formación del embrión, cuáles son las estructuras que origina y, a la luz de los estudios de biología molecular y del desarrollo, qué mecanismos genéticos justifican su papel en la etiología de la HDC.

4.- LA CRESTA NEURAL. EL SISTEMA NERVIOSO ENTERICO

4.1.- CONCEPTO:

El término “cresta neural” (CN) fue usado por primera vez por Arthur Milnes-Marshall en 1879 para hacer referencia a las estructuras longitudinales situadas entre el epiblasto externo y el canal neural en los embriones de pollo, cuyas células darían lugar a los ganglios craneales y espinales²⁰². Desde entonces esta efímera estructura no ha dejado de fascinar a biólogos y anatomistas, así como a otros estudiosos del desarrollo embrionario. Sin embargo no fue hasta la aparición de las primeras publicaciones del estudio de las células neurocristales en quimeras (embriones de pollo a los que se transplantan células provenientes de la CN de embriones de codorniz)²⁰³, cuando se pudo seguir el trayecto de dichas células, pues son fácilmente identificables más tarde en el embrión.

Gracias a dichos experimentos y a la identificación en años siguientes de múltiples marcadores de la CN, sabemos hoy que está formada por una población celular migratoria que da lugar a múltiples tipos celulares. Estas células aparecen en los pliegues neurales, en la zona de unión del ectodermo neural con el ectodermo epidérmico a partir del decimoctavo día (Figuras 8 y 9).

Otro aspecto muy importante de la CN es su constancia evolutiva. Se trata de una sinapomorfia de los animales craneados, lo que significa que todos ellos comparten su existencia. De ahí que los evolucionistas busquen en ella el origen del cráneo, una especie de “añadido” o segunda cabeza a una evolutivamente más antigua no osificada que sigue estando presente en animales no craneados en los que no existe CN.²⁰⁴.

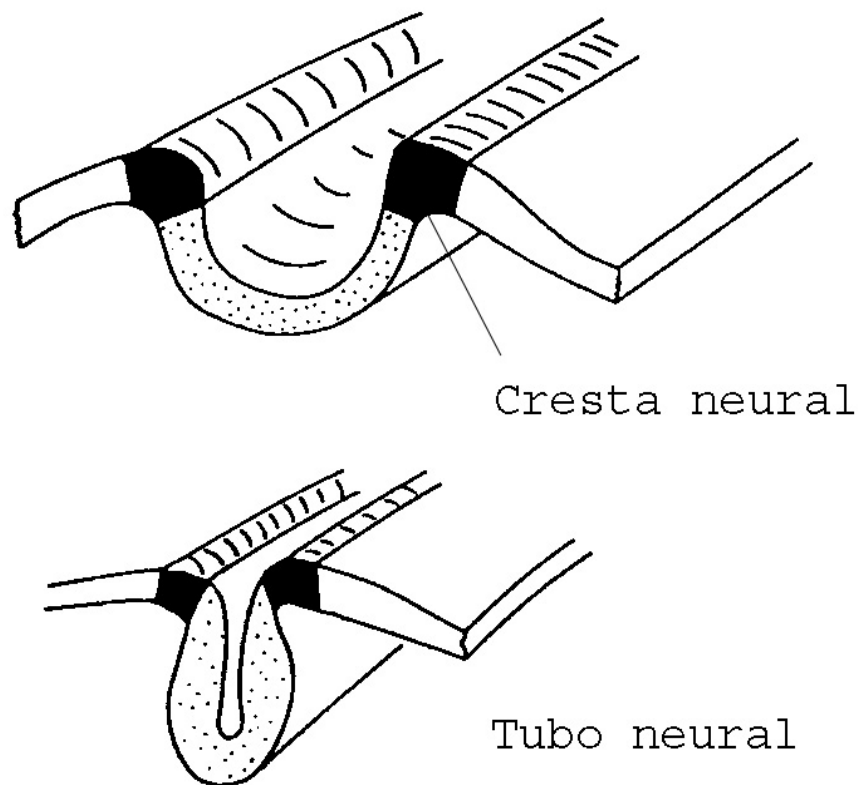


Figura 8. Representación de 2 cortes transversales del embrión que muestran la formación del tubo neural. La cresta neural (negro) se forma en la unión entre el ectodermo neural (tubo neural, punteado) y el ectodermo epidérmico o superficial (blanco).

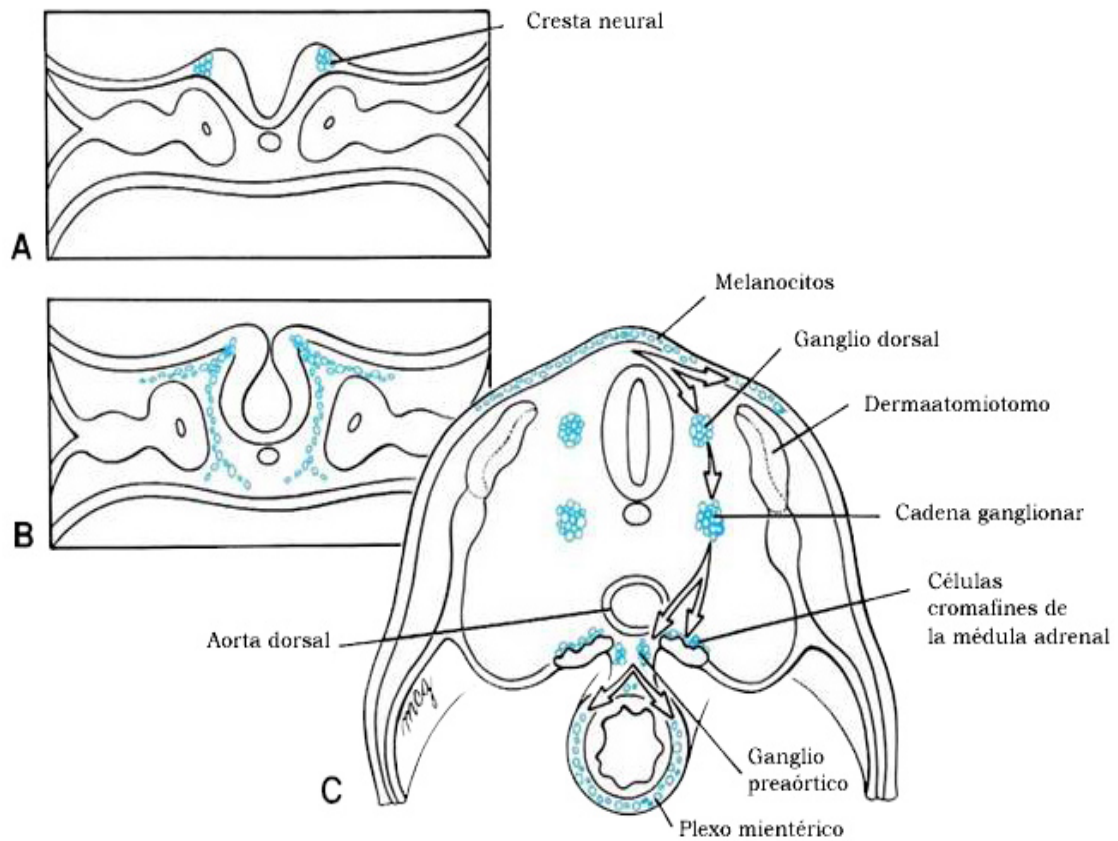


Figura 9: Esquema de la situación inicial de las células neurocristales marcadas en azul antes (A) y durante el plegue del tubo neural (B). Un corte transversal del embrión (C) nos da idea de su migración y la colonización de diferentes órganos diana. Modificado de WJ Larsen: Human Embriology, Churchill Livingstone, 1997.

4.2.- LA CN COMO CUARTA HOJA GERMINAL:

La teoría de las tres hojas germinales fue aplicada por primera vez a embriones de vertebrados por Ernst Haeckel en 1874²⁰⁵. Según esta teoría los embriones se formarían por diferenciación de las tres hojas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. Estructuras homólogas en diferentes animales se originarían de las mismas hojas germinales. Así, los músculos, los tejidos vasculares y los tejidos conectivos se originan de la hoja germinal mesodérmica, los nervios y la epidermis de la ectodérmica y el tracto gastrointestinal de la endodérmica. Autores como Brian K. Hall consideran a la CN como una cuarta hoja germinal, y por tanto los animales ya no serían triblásticos sino tetrablásticos²⁰⁶. Muchos clínicos y genetistas apoyaron esta teoría cuando se reconoció la existencia de las neurocristopatías, enfermedades en las que los tejidos y órganos afectados tienen en común, como ya veremos, su origen en la CN.

El ectodermo y el endodermo son las primeras hojas germinales que aparecen en la evolución animal y las primeras en formarse en el embrión. El mesodermo es una hoja germinal secundaria que aparece tras interacciones inductivas entre el ectodermo y el endodermo. Como la CN también se desarrolla por inducción desde una hoja germinal primaria, es considerada como una hoja secundaria²⁰⁶. Existe una gran variedad de tipos celulares que derivan de la CN, así como tejidos y órganos a cuya formación contribuye la CN, ya sea directamente aportando células o indirectamente aportando el ambiente apropiado para que otras células se desarrollen (Figura 8). Esta importante variedad de células refuerza la teoría que considera a la CN como una cuarta hoja germinal.

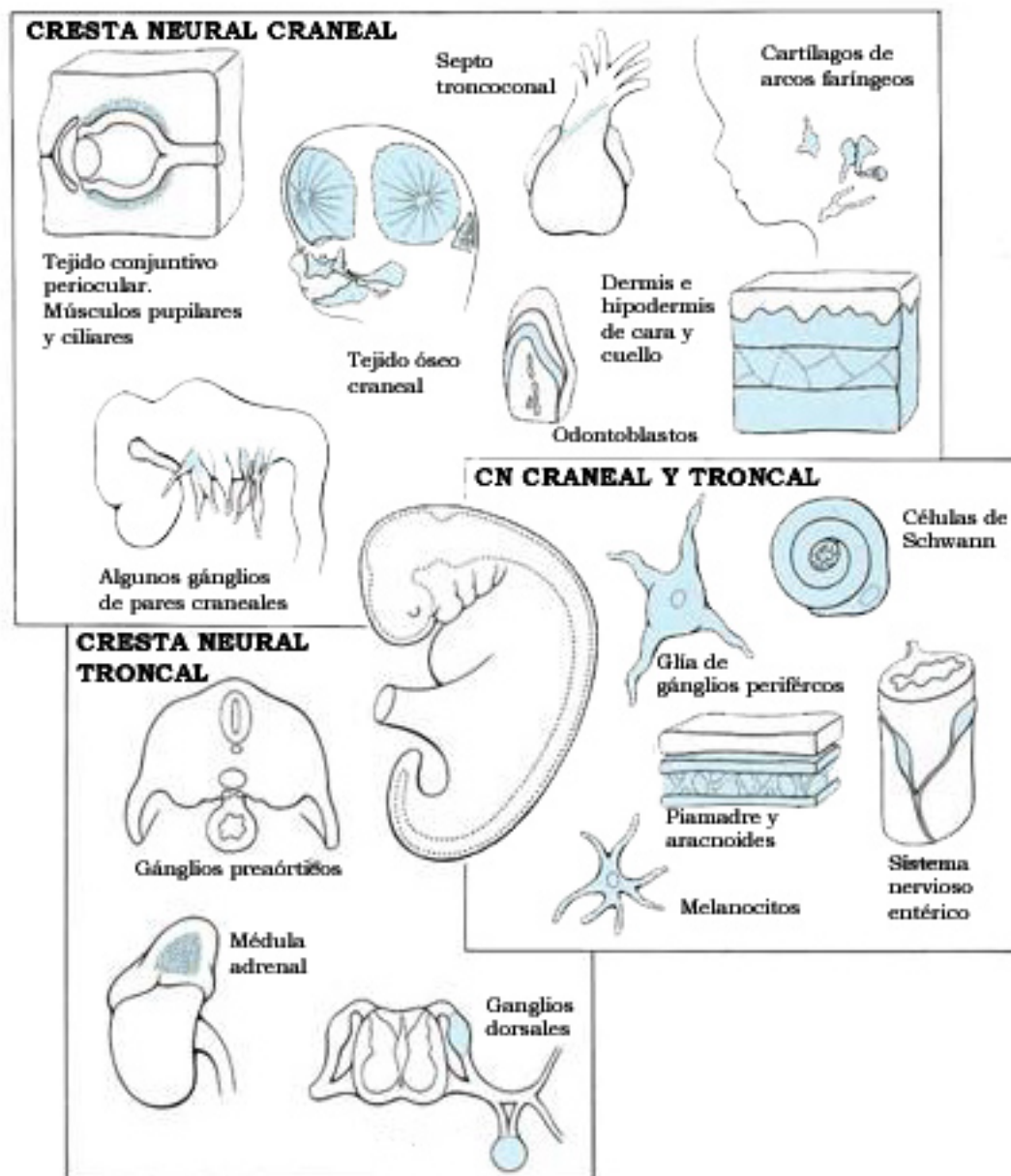


Figura 10: Representación esquemática de algunas de las estructuras derivadas de la CN craneal y troncal. Se incluyen tanto células específicas como órganos que contienen al menos un tipo celular derivado de la CN. Modificado de WJ Larsen: Human Embriology, Churchill Livingstone, 1997.

4.3.- CN CRANEAL O PRE-ÓTICA Y TRONCAL O POST-ÓTICA:

Un hallazgo curioso en la diferenciación normal de las células de la CN es el diferente desarrollo de las células de la región cefálica del embrión (cresta craneal) y las de la región caudal (cresta troncal) (Figura 10).

Las células de la CN craneal siguen diferentes rutas migratorias, predeterminadas por su nivel axial de origen^{207,208}. Las células más rostrales o preóticas pueblan el proceso frontonasal y el primer arco branquial, dando lugar al tercio superior de la cara, el maxilar y la mandíbula. Las inmediatamente anteriores a la placoda ótica pueblan el segundo arco branquial, y las superpuestas a los somitos 1 a 5 pueblan el tercero, cuarto y sexto arcos branquiales. Las células de esta área también migran ventral y caudalmente para participar en la septación cardíaca²⁰⁹ (Figura 11).

Las células de la CN troncal o post-ótica dan lugar a la mayoría de las estructuras mesenquimales craneofaciales, incluyendo el esqueleto y el tejido conectivo faciales, que servirán de soporte a los músculos y órganos derivados de los arcos branquiales.

4.4.- LA CN COMO ORIGEN DE LOS NERVIOS VAGOS Y DE LAS CELULAS NERVIOSAS DEL TUBO DIGESTIVO:

Las células de la CN de las regiones del mesencéfalo y prosencéfalo caudal dan lugar al ganglio parasimpático del III par craneal, al tejido conjuntivo que rodea a los ojos y a los nervios ópticos, a los músculos de la pupila y del cuerpo ciliar del globo ocular y al mesénquima de la cabeza. Además, de la CN derivan también la aracnoides y la piamadre. Las células de la

CN de las regiones del mesencéfalo y rombencéfalo también producen estructuras en los arcos faríngeos, tales como huesos de nariz, cara u oído medio. Por último, la CN rombencefálica contribuye a la formación de los ganglios de los pares craneales. De ellas derivan las neuronas y las células gliales de los ganglios parasimpáticos de los pares VII, IX y X, y algunas neuronas y toda la glía de los ganglios sensitivos de los pares V, VII, VIII, IX y X (Figura 12) ¹⁹.

Por otra parte, las neuronas y células gliales que forman el sistema nervioso entérico (SNE) derivan de células de la CN que emigran desde dos niveles rostrocaudales del eje neural: las regiones vagal y sacra. La región vagal se define como la porción post-ótica que corresponde a los somitos 1-7, mientras que la región sacra es caudal al somito 28 en embriones de pollo o al somito 24 en el ratón²¹⁰.

La primera demostración de este origen data de 1973²¹¹, cuando ya se conocía la facultad de marcar células de CN usando animales quimeras de pollo y codorniz. En este trabajo se sugería que tanto las células del nivel vagal como las sacras contribuían al origen del SNE, aunque esta últimas con menor importancia. Hoy sin embargo se sabe que ambas líneas celulares contribuyen independientemente a la formación del SNE emigrando en direcciones opuestas a lo largo y dentro del intestino; además se sabe que las células provenientes de la región vagal son más invasivas que las sacras, manteniendo esta capacidad de emigrar e invadir tejidos incluso cuando son transplantadas a la región sacra²¹².

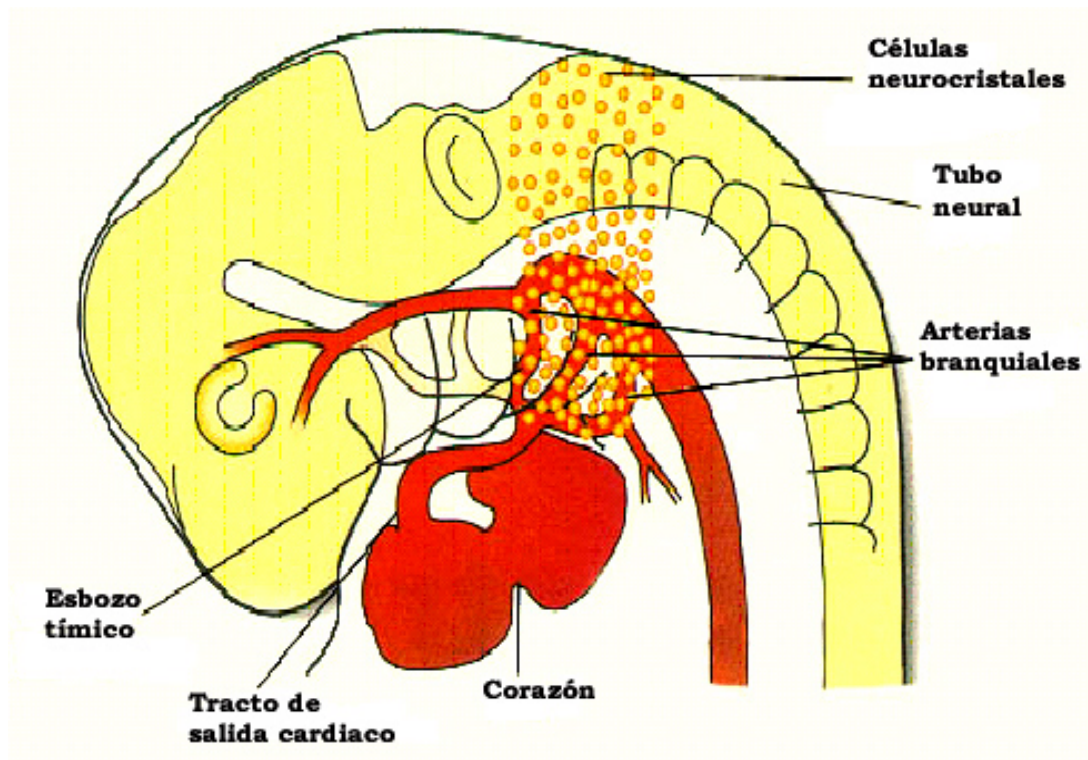


Figura 11: Esquema de la migración de las células de la cresta neural y la colonización de las estructuras de los arcos branquiales, el corazón y los grandes vasos. Modificado de W.J. Larsen, Embriología Humana, Churchill Livingstone, 2003.

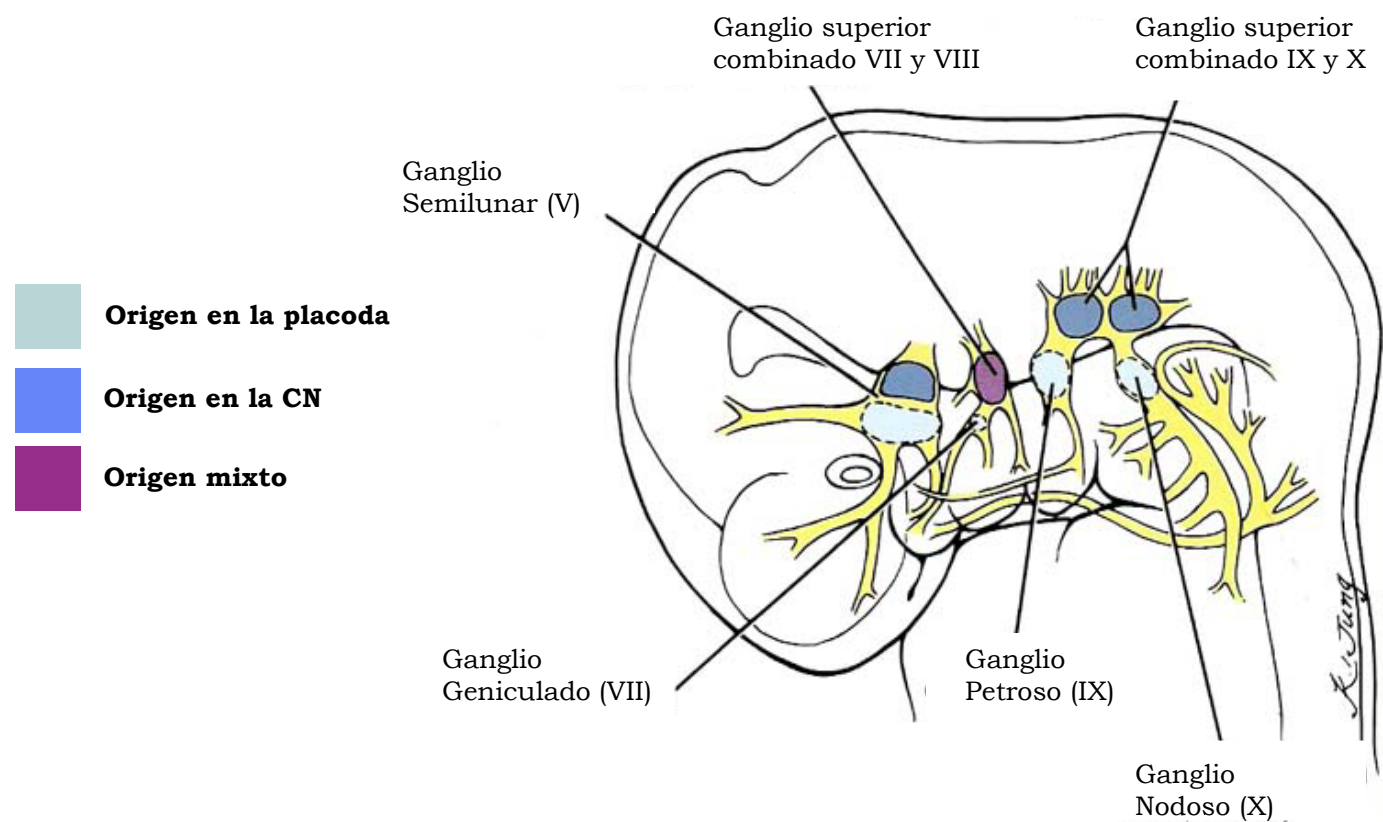


Figura 12: representación esquemática del origen de los ganglios de algunos pares craneales en el embrión de 5 semanas. Las células de la CN contribuyen a la formación de las neuronas y células gliales de los pares V, VII, IX y X.

4.5.- FORMACION DE GANGLIOS Y DIFERENCIACION DE LAS NEURONAS INTESTINALES:

El SNE es un sistema nervioso evolutivamente muy diferenciado. En él hay más neuronas que en la médula espinal²¹³, de manera que se estima que el intestino delgado y grueso del ratón adulto hay unas 400-900 neuronas por milímetro cuadrado. Todas ellas además de un número indeterminado de células gliales derivan de apenas 1000 células de la CN.

Las células neurocristales emigran al intestino medio del embrión de pollo y de ratón a través de la parte externa del mesénquima intestinal, justo bajo la serosa, donde se formará el plexo mientérico²¹⁴. En este punto del desarrollo el mesénquima intestinal no se ha desarrollado y no existen por tanto las capas musculares circular y longitudinal²¹⁵. Hasta 5 ó 6 días más tarde no se ven células derivadas de la CN en el plexo submucoso, por lo que se piensa que éste deriva de una emigración secundaria de células provenientes del plexo mientérico^{216,217}.

Por lo que respecta al colon y al recto, las células de la CN vagal siguen una ruta migratoria a lo largo del mesénquima más interno, justo donde se formará el plexo submucoso, desde donde algunas células emigrarán más tarde hacia fuera para formar, en esta ocasión, el plexo mientérico²¹⁸. Esto se piensa que es así porque cuando las células neurocristales llegan al intestino grueso el mesénquima ya se ha desarrollado y la capa muscular circular ya existe.

Durante algunos días después de la colonización las células se encuentran distribuidas uniformemente, sin signos de agrupamientos. A medida que el intestino crece, las células van formando pequeñas

agrupaciones o ganglios tanto a nivel mientérico como submucoso²¹⁹. Los factores que hacen que las células se agrupen para formar ganglios son desconocidos.

Por otra parte, sabemos que las células maduras del SNE son de muy diversos tipos, con distintos neurotransmisores y funciones²²⁰. De nuevo, poco se sabe acerca de los factores que hacen que una célula neurocristal indiferenciada dé lugar a una célula glial o a un tipo particular de neurona.

5.- LAS NEUROCRISTOPATIAS

5.1. CONCEPTO:

El interés que ha despertado la CN en los últimos años ha sido consecuencia de su implicación en diversas anomalías craneofaciales y otras enfermedades relacionadas con el sistema nervioso entérico como la enfermedad de Hirschsprung.

El concepto de neurocristopatía fue introducido por Bolande en 1974²²¹ para explicar las relaciones que existían en el desarrollo de un grupo de enfermedades disgenéticas, hamartomatosas y neoplásicas como el feocromocitoma, la neurofibromatosis, la enfermedad de Hirschsprung, y múltiples adenomatosis endocrinas.

Una neurocristopatía es una entidad patológica derivada de aberraciones o defectos en cualquiera de los momentos del desarrollo de las células de

la CN, ya sea la migración precoz, el crecimiento, la proliferación, la interacción célula a célula o la diferenciación. De esta manera, entidades tan dispares como el síndrome de Di George, la neurofibromatosis, el labio y paladar hendidos, la melanosis neurocutánea o la enfermedad de Hirschsprung son consideradas todas como neurocristopatías. De hecho, las neurocristopatías pueden afectar a la medula adrenal, los órganos endocrinos de origen neurocristal, las células pigmentadas, las células de Schwann, los ganglios del sistema nervioso autónomo, el corazón, el esqueleto craneofacial y las células mesenquimales de la CN²²².

Inicialmente Bolande dividió las neurocristopatías en simples o complejas. Las simples eran aquellas en las que se producía una displasia local en una sola célula de la CN y ocasionando una única patología, por ejemplo el feocromocitoma. Las neurocristopatías complejas eran aquellas en las que existía una alteración genética de tal forma que el gen alterado modificaba la diferenciación de las células de la CN, dando lugar a patologías varias, por ejemplo la neurofibromatosis, con alteraciones en las células de Schwann, manchas de café con leche y tumores neuroectodérmicos. En la mayoría de las enfermedades consideradas por Bolande como neurocristopatías, las células de la CN parecían estar bien formadas y migraban a la localización adecuada, pero luego fallaba su diferenciación o crecimiento^{221,222}.

En la Tabla I se ofrece, de manera resumida, una clasificación de algunas de estas neurocristopatías en función de su origen, alteraciones en la migración o en la proliferación de las células de la CN.

MIGRACION	PROLIFERACION
Alteraciones de la cámara ocular anterior	Feocromocitomas
Alteraciones de la septación aortopulmonar	Neuroblastoma
Asociación CHARGE	Tumor neuroectodérmico primitivo (PNET)
Labio hendido/fisura palatina	Carcinoma medular del tiroides
Síndrome de DiGeorge	Tumor carcinoide
Displasia frontonasal	Síndrome de Wermer
Síndrome de Goldenhar	Melanosis neurocutánea
Enfermedad de Hirschsprung	Pronogoma melanótico
Síndrome de Waardenburg	
Embriopatía por retinoico	

Tabla I: resumen de algunas neurocristopatías agrupadas en función del defecto inicial, ya sea en la migración, ya en la proliferación de las células de la cresta neural.

5.2. DEFECTOS CRANEOFACIALES:

El 70% de todos los defectos congénitos afectan a la cabeza y el cuello. De estos, el 10% acompañan a anomalías cromosómicas, el 20% se deben a defectos en genes concretos que producen complejos síndromes y el 70% restante son de origen poligenético o multifactorial.

Los defectos craneofaciales que afectan a las células de la CN se pueden producir por mecanismos muy diversos^{204,206,223}, con consecuencias desiguales, provocando síndromes o malformaciones como el albinismo, el síndrome de Waardenburg, la disostosis mandibulofacial o síndrome de Treacher Collins, el síndrome de Franceschetti-Zwahlen-Klein, la microsomía hemifacial o síndrome de Goldenhar-Gorlin, la anomalía o secuencia de Di George, los síndromes que asocian fisuras orofaciales o, más relacionado con la cirugía pediátrica, la asociación CHARGE (acrónimo en inglés de la asociación de **c**oloboma, **h**earth disease, **a**tresia of choanae, **r**etardation of physical and mental development, **g**enital hypoplasia in males and **e**ar anomalies and/or deafness, en español respectivamente coloboma, cardiopatía, atresia de coanas, retraso del desarrollo físico y mental, hipoplasia genital masculina y anomalías auriculares y/o sordera)²²⁴⁻²²⁹.

5.3.- TUMORES:

La enfermedad tumoral es rara en el recién nacido o en el feto. La mitad de los casos son leucemias o tumores renales. La otra mitad son neuroblastomas, tumores de la médula adrenal y del sistema nervioso autónomo, es decir, dependientes de la cresta neural²⁰⁶.

5.3.1.- Neuroblastomas: Se consideran neurocristopatías porque sus células neoplásicas son exclusivamente de origen neurocristal. Su apariencia microscópica suele ser idéntica a la de las células migradoras de la CN, es decir, células neurales indiferenciadas. Estas células sufren frecuentemente fenómenos de maduración espontánea, formando entonces un ganglioneuroma o un neurofibroma pero nunca madurando hacia neuronas o células cromafines. Esta capacidad de regresión es un fenómeno para el que aún no tenemos una respuesta satisfactoria ²³⁰. Como cualquier otra neurocristopatía, el neuroblastoma puede encontrarse además asociado a otros defectos de la migración de las células de la CN, como la enfermedad de Hirschsprung, los Apudomas, el síndrome de DiGeorge o defectos de la septación cardiaca²³¹⁻²³⁷

5.3.2.- Neurofibromas y Neurofibromatosis de von Recklinghausen: El neurofibroma es el tumor más frecuente del sistema nervioso y las células pigmentarias. Afecta a 1 de cada 2500 recién nacidos vivos. Por su parte, la neurofibromatosis más frecuente (tipo I) se debe a una mutación adquirida o de novo en el brazo largo del cromosoma 17. Se caracteriza por la presencia de manchas tipo “café con leche” en la piel y por la presencia de neurofibromas. Además, puede asociarse a otros defectos de estructuras mesodérmicas como escoliosis, pseudoartrosis tibial, leucemia, o tumor de Wilms ²³⁸⁻²⁴².

5.3.3.- Apudomas: El acrónimo APUD (en inglés, aquellas células caracterizadas por su capacidad de *amine precursor uptake and decarboxylation*, en español “captador y decarboxilador de los precursores de las aminas”), fue usado por vez primera por Pearse en 1969 ²⁴³. Este grupo incluye las células sintetizadoras de hormonas polipeptídicas intestinales, las células productoras de calcitonina que se encuentran en el tiroides humano o en la glándula ultimobranquial animal y algunas

células del páncreas, la glándula adrenal y el cuerpo carotídeo. Aproximadamente 40 líneas celulares diferentes del sistema APUD son derivadas directamente de las células de la cresta neural²⁴⁴. Cualquier tumor dependiente de uno de estos tipos celulares se agrupa dentro de los apudomas.

5.4.- CARDIOPATIAS:

El proceso de septación conotruncal aortopulmonar, las válvulas cardíacas y los grandes vasos también dependen de las células de la CN. Es conocido que la ablación de la CN cardíaca (es decir, la que va de los somitos 1 a 3) produce en los embriones de pollo o ratón ductus arterioso persistente, malformaciones del septo aortopulmonar, transposición de grandes vasos, comunicaciones inter-ventriculares (CIV) y ventrículo derecho de doble salida entre otros ^{209,227,245-248}.

5.5.- ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG:

Obviamente, la ausencia de elementos neuronales en la parte distal del intestino grueso es una alteración del proceso normal de migración de las células de la CN. Las investigaciones sobre esta enfermedad han sido ampliadas en los últimos años gracias a la evidencia de la implicación del proto-oncogen *ret* en la etiología de algunos casos familiares y a la aparición de un modelo experimental con un animal “*knock-out*” para este gen que reproduce la malformación²⁴⁹. Además, también se han encontrado mutaciones de este gen en una gran proporción de carcinomas papilares de tiroides y neoplasias endocrinas múltiples tipo MEN 2A y 2B²⁵⁰⁻²⁵³.

5.6.- LA HDC COMO NEUROCRISTOPATIA

Como hemos dicho más arriba, la mayoría de las series clínicas de HDC señalan que la presencia de malformaciones asociadas al defecto es muy frecuente, más si se tienen en cuenta los abortos y mortinatos con hernia, grupo en el que esta presencia alcanza el 100%^{126,127,254,255}

La asociación de defectos faciales es conocida en algunos síndromes que asocian HDC, como el de Fryns^{7,256}, Pallister Killian²⁵⁷ o Wolf-Hirschhorn^{258,259}. En concreto en el síndrome de Fryns, la HDC puede acompañarse de defectos cardiovasculares o enfermedad de Hirschsprung²⁶⁰, por lo que algunos autores la consideran una auténtica neurocristopatía^{261,262}. Además, los ratones expuestos a nitrofen presentan alteraciones craneofaciales similares a las del síndrome humano²⁰⁰, también en lo que respecta a las malformaciones de las estructuras de los arcos branquiales²⁶³.

En cuanto a las malformaciones en estructuras derivadas de los arcos faríngeos, existe poca evidencia en la literatura respecto a su asociación en humanos con HDC. En nuestra propia serie de 136 autopsias realizadas entre 1965 y 1992 son pocas las alteraciones tímicas o paratiroides recogidas. Sin embargo, en el modelo experimental tanto el timo, como las paratiroides²⁶⁴ o las células C tiroideas²⁶⁵ presentan malformaciones más o menos severas. Es interesante observar que otros teratógenos que también causan HDC provocan estos mismos defectos faciales, branquiales e incluso cardiovasculares²⁶⁶⁻²⁶⁸, lo que sugiere que un mismo mecanismo dismorfogenético que afecta a la CN está probablemente involucrado en la etiopatogenia de la HDC.

Las malformaciones cardiovasculares presentes en individuos con HDC han sido ampliamente estudiadas^{16,269-272}. Aunque en distintas proporciones, tanto en los pacientes²⁷² como en las autopsias¹⁴ esta patología es muy frecuente. En un estudio de nuestro grupo analizando los resultados en autopsias y las presentes en los fetos de rata expuestos a nitrofen, demostramos que la mayoría de las cardiopatías seguían un patrón neurocristal, pues eran defectos cronotruncales o de los vasos faríngeos^{14,264}, hallazgo que también confirmaron otros grupos^{273,274}.

En suma, la HDC asocia tanto en el humano como en el ámbito experimental, múltiples anomalías que afectan a estructuras derivadas de la CN. Dada su extensión y su similitud parece obvio pensar que una alteración neurocristal puede ser el origen de esta malformación. A continuación analizamos los factores moleculares y genéticos involucrados en la organogénesis de la CN y su relación con la HDC, ofreciendo más evidencias de este probable origen.

6.- MECANISMOS MOLECULARES Y GENETICOS: RELACION DE LA CN Y LA HDC

Durante los últimos 20 años las líneas de investigación más importantes de nuestro grupo se han dirigido al estudio de la HDC y la AE en el campo experimental. Uno de los hallazgos más sorprendentes ha sido, sin duda, la similitud entre las malformaciones reproducidas en condiciones de laboratorio y las correspondientes entidades patológicas humanas^{201,275}.

El nexo de unión de ambas podría estar en la CN, una de las estructuras embrionarias más fascinante y más extensivamente estudiadas en las últimas décadas. Aunque son incontables los estudios de los mecanismos moleculares y genéticos involucrados en el control neurocristal, intentamos resumir en los siguientes apartados aquellos más relacionados con la HDC y la AE. De nuevo la similitud de estos mecanismos en ambas patologías habla de un probable origen común de las dos.

6.1.- SONIC HEDGEHOG(Shh)-PATCHED (Ptch)-SMOOTHENED (Smo)-Gli

Shh es imprescindible en el desarrollo de las estructuras craneofaciales, en la separación del intestino anterior y en la formación del corazón y los grandes vasos. Shh se une a una proteína de la membrana celular (Ptch) que, al separarse así de otra proteína (Smo) permite la activación de los factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3. Estos, a su vez, activan determinados genes en el núcleo celular²⁷⁶. Algunos estudios en humanos con AE muestran como Shh está presente en el bolsón proximal de la atresia pero ausente en el distal, mientras que las proteínas Gli se expresan en los dos²⁷⁷. En explantes de pulmón de ratón tratado con

adriamicina, está demostrado cómo una alteración de Shh es la causante de la formación de la fistula traqueo-esofágica²⁷⁸. La adriamicina causa una pérdida de la expresión de Shh en el intestino anterior²⁷⁹ y, por último, los ratones mutantes para Shh y proteínas Gli1, Gli2 y Gli3 presentan varios componentes de la asociación VACTERL incluyendo fistula traqueoesofágica²⁸⁰.

Curiosamente muchos de estos animales mutantes tienen también anomalías del desarrollo pulmonar. De hecho, los dobles mutantes para Gli 2^{-/-}, Gli 3^{+/-} and Gli 2^{-/-}, Ptc 3^{+/-} muestran proporciones altas de HDC junto a otras anomalías²⁸⁰. Shh además se encuentra regulado a la baja en los pulmones hipoplásicos de ratas con HDC inducida con nitrofen²⁸¹.

Shh es también responsable en parte de la migración normal de las células de la CN²⁸². Su supresión produce anomalías de los arcos aórticos y cardiopatías conotruncuales²⁸³ y su bloqueo con anticuerpos específicos provoca alteraciones de los arcos faríngeos²⁸⁴. El cultivo *in vitro* de embriones de ratón expuestos a un bloqueador de las señales de Shh, la ciclopamina, induce defectos craneofaciales²⁸⁵. La mutación de Shh en humanos se asocia con frecuencia a defectos en los derivados de los arcos faríngeos²⁸⁶. Al mismo tiempo, la similitud de los defectos craneofaciales presentes en humanos con síndrome de alcoholismo fetal y los causados por mutaciones en Shh, llevó a demostrar que el etanol regula a la baja la expresión de este gen y que la adición de Shh *in vitro* mejora las lesiones craneofaciales en el embrión de pollo²⁸³ y modula la migración y proliferación de las células de la CN en explantes cultivados²⁸⁷. Finalmente, los defectos craneofaciales observados en el síndrome de la delección de 22q11.2 son debidos en parte a alteraciones en la expresión de Tbx1, un factor de transcripción codificado en ese locus y que, en roedores, es dependiente de Shh²⁸⁸.

6.2.- GENES Hox:

La palabra griega “homeo” significa semejante y los genes homeóticos (HOM) de la *Drosophila melanogaster* fueron así bautizados por su capacidad, cuando eran mutados, para transformar un segmento del cuerpo del insecto en algo parecido a otro segmento diferente²⁸⁹. Todos comparten un elemento estructural, el homeobox, una secuencia común de 180 pares de bases y que también se conserva en los genes de plantas, hongos esponjas o vertebrados. Estos genes codifican factores de transcripción que autorregulan su propia transcripción o la de otros genes implicados en el desarrollo embrionario²⁹⁰, y se encargan de aportar información sobre el plan corporal que determina la segmentación axial y el desarrollo a lo largo del eje anteroposterior, e influyen fuertemente en la organogénesis regional a través de la diferenciación mesenquimal y de las interacciones epitelio-mesenquimales. En el ratón y en el humano existen numerosos genes homeobox. Una parte de ellos que se encuentra de alguna manera agrupada son los genes Hox, 39 genes que conservan cierta homología y se organizan en 13 grupos parálogos de 9 a 11 genes cada uno localizados en 4 cromosomas diferentes: Hoxa, Hoxb, Hoxc y Hoxd, que en el humano se encuentran respectivamente en los cromosomas 7, 17, 12 y 2.

Basándose en la similitud de las secuencias de nucleótidos y en su posición relativa dentro de cada grupo, cada gen individual puede ser alineado con los de los otros grupos y a su vez con los del complejo HOM de la *Drosophila* (Figura 13). Este y otros hallazgos parecen indicar que los cuatro grupos Hox de los mamíferos proceden de un complejo único ancestral²⁹¹.

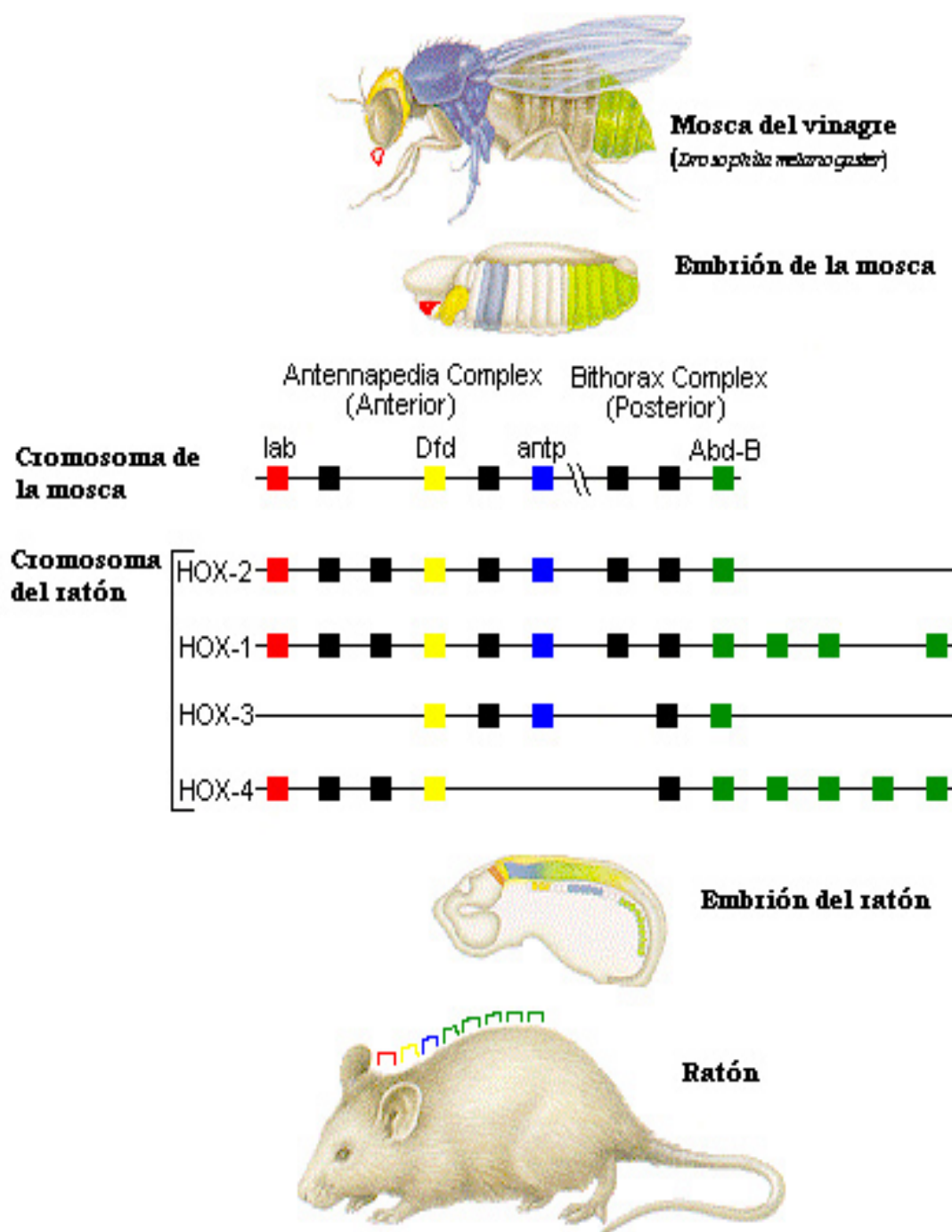


Figura 13: representación esquemática de los genes Hox y su correspondencia entre los existentes en un solo cromosoma en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y en 4 cromosomas en el ratón.

Los genes Hox se expresan en las 3 hojas germinales, en dominios o segmentos con un límite anterior que es específico para cada gen. La organización de los genes en cada complejo es fundamental para la regulación espaciotemporal precisa y, por tanto, para la correcta formación del embrión. De esta manera, el orden relativo de los genes Hox dentro de un mismo grupo condiciona su momento de activación y su lugar o dominio de expresión concreto a lo largo del eje anteroposterior (rostrocaudal): los genes más próximos al lugar 3' del cromosoma se expresan antes y en dominios más anteriores que los genes localizados más cercanos a 5', propiedad llamada colinearidad espacial. Consecuentemente, la combinación específica de las proteínas Hox dentro de una región particular le concede una identidad peculiar y única^{292,293}.

Pero no todo es tan sencillo, pues los genes Hox funcionan como circuitos altamente integrados de manera que genes parálogos, genes adyacentes dentro de un mismo grupo e incluso genes no parálogos de grupos diferentes interaccionan entre sí positiva o negativamente o en paralelo, orquestando así la regionalización morfológica del embrión²⁹⁴.

La evidencia definitiva de la base genética de las transformaciones homeóticas fue obtenida mediante el aislamiento de algunos mutantes espontáneos. El primero fue encontrado por Calvin Bridges en el laboratorio del Dr. Thomas Hunt Morgan en 1915. Este mutante sufría una duplicación parcial del tórax (es conocido por tanto como *bithorax* o *bx*) por la transformación del tercer segmento torácico hacia el segundo (Figura 14)²⁹⁵.



Figura 14: Fotografía del mutante bithorax o bx de la *Drosophila melanogaster* o mosca del vinagre. La transformación del tercer segmento torácico en el segundo provoca la duplicación de las alas.

La importancia funcional del código de los genes Hox en la especificación de las identidades posicionales durante el desarrollo en vertebrados ha sido establecida en varios tipos de experimentos: expresión ectópica de genes Hox, creación de mutantes con “pérdida de función”, modulación de genes *in vivo* mediante ácido retinoico y por experimentos de trasplante de genes²⁹⁶. Hasta la fecha el análisis de las funciones de estos genes ha ido mayoritariamente dirigido hacia la comprensión de su papel en el desarrollo somítico, en la formación del esqueleto derivado de la CN, el sistema nervioso central y los miembros. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel que estos genes juegan en la organogénesis²⁹⁷.

El primer ratón mutante para un gen Hox, el *Hoxa3*, tenía múltiples defectos, especialmente en estructuras faríngeas derivadas de la CN, así como graves cardiopatías congénitas, lo que le asemejaba al síndrome de DiGeorge^{298,299}. Los mutantes para *Hoxa1*, sin embargo, presentan anomalías romboméricas con escasas anomalías del esqueleto facial, mientras que la pérdida de *Hoxa2* ocasiona la pérdida de los cartílagos y huesos derivados del segundo arco branquial (estiloides y cuerno menor del hioides) y malformaciones el oído y el hueso temporal³⁰⁰. De la misma manera, la ausencia junto con *Hoxa3* de *Hoxb3* o *Hoxd3*, condiciona las mismas malformaciones junto con disminución de las células C tiroideas, alteraciones laringotraqueales y defecto de los pares craneales²⁹⁷. La similitud entre estos defectos y los observados en el Síndrome de DiGeorge en humanos es sorprendente; sin embargo este síndrome puede aparecer en individuos con traslocaciones en el cromosoma 22, mientras que el gen *Hoxa3* está localizado en el 7, lo que sugiere que, aunque los genes no coincidan, los mecanismos moleculares que compartan estas malformaciones han de ser similares³⁰¹.

Por otro lado, la ausencia de *Hoxc4* origina sorprendentemente una obstrucción esofágica por desaparición progresiva del tubo digestivo en el mesénquima torácico junto con malformaciones vertebrales³⁰², y ratones mutantes para *Hoxa5* también presentan malformaciones laringotraqueales varias²⁹².

La semejanza de las alteraciones esofágicas y respiratorias observadas en algunos mutantes para genes *Hox* concretos^{292,302-304} con las descritas en la atresia de esófago (AE), así como la implicación de algunos de sus factores de transcripción en la etiología de esta enfermedad en su modelo experimental³⁰⁵⁻³⁰⁷, apoyan su probable participación en la etiología de esta malformación. Así, *Hoxa5* es necesario para el desarrollo pulmonar y está involucrado en la patogenia de la AE y, quizás, en la HDC; los dobles mutantes para este gen exhiben estenosis traqueal y malformaciones del cartílago respiratorio²⁹² que recuerdan a las descritas en los modelos experimentales de AE^{308,309} y HDC¹⁹⁸, y en parte a las encontradas en los humanos con estas malformaciones^{310,311}. Por su parte, *Hoxb5* se expresa en varios estadios del desarrollo pulmonar³¹², estando esta expresión retrasada en los pulmones de ratas expuestas a nitrofen³¹³ y disminuida en algunos casos de secuestro broncopulmonar en humanos³¹⁴.

En lo que respecta al intestino, el papel que juegan estos genes en su desarrollo es menos conocido. Algunos de ellos, especialmente los de los grupos 9-13 se sabe que están implicados en la formación de la porción intestinal más distal, de forma que los mutantes para *Hoxd13* y *Hoxa13* tienen malformaciones de la musculatura rectal³¹⁵. Genes de grupos más anteriores (del 1 al 9) también han sido parcialmente estudiados, especialmente los grupos 4 y 5, que parecen fundamentales para un correcto desarrollo intestinal²⁹⁰. Posiblemente estos genes actuarían como reguladores de la morfogénesis del tracto gastrointestinal, particularmente

de la migración y maduración de las células derivadas de la cresta neural y de las células mesodérmicas espláncicas³¹⁶ y, adicionalmente, en los procesos de adaptación y regeneración intestinal³¹⁷

Por ejemplo, *Hoxb5* se expresa en el intestino embrionario humano durante el proceso de migración de las células de la CN. A medida que estas células avanzan dentro de la pared intestinal, *Hoxb5* se expresa en la misma región, perdiendo dicha expresión en las regiones más proximales ya colonizadas. Cuando el proceso termina, el intestino deja de expresar *Hoxb5*, que se mantiene tan solo y de forma débil en las mismas células neurocristales³¹⁸. La deficiente innervación esofágica descrita tanto en el humano como en los animales portadores de AE^{177,178,319} indica, quizás, que la acción de alguno de estos genes *Hox* está alterada. Lo mismo puede ocurrir en la HDC, que tanto en clínica como en el laboratorio, comparte ciertas características embriológicas y malformaciones asociadas con la AE.

6.3.- ACIDO RETINOICO (AR) Y SUS RECEPTORES (RAR Y RXR):

La participación de estas moléculas en el desarrollo embrionario es bien conocida. La descendencia de ratas alimentadas con dieta deficitaria en vitamina A padece múltiples malformaciones que incluyen defectos diafragmáticos, a la vez que el suplemento con retinol (vitamina A) durante la gestación disminuye la incidencia de estos defectos³²⁰. Recientemente se ha demostrado que los niveles de retinol y su proteína transportadora (RBP) están disminuidos en los recién nacidos con HDC³²¹. El retinol es el precursor del ácido retinoico (AR), formado intracelularmente por acción de las enzimas retinal y retinol-deshidrogenasa. El AR a su vez se une a los receptores nucleares RAR y RXR para regular la expresión de múltiples genes^{194,322}.

El nitrofen produce una alteración en la cascada del AR³²³, de manera tal que su demostración ha abierto una nueva vía etiopatogénica de esta malformación¹⁹⁴, la llamada “hipótesis del retinoico”. De hecho, no solo el nitrofen, sino también los otros teratógenos que inducen HDC (bis-diamina, ácido 4-bifenil-carboxílico y SB-210661) inhiben la retinal-deshidrogenasa de manera dosis dependiente³²⁴, aunque este enzima no esté disminuida en los pulmones hipoplásicos de las ratas expuestas al herbicida³²⁵. Una evidencia añadida es que el retinol administrado a las madres gestantes expuestas a nitrofen disminuye la incidencia de HDC en la descendencia y mejora la hipoplasia e inmadurez pulmonar de los fetos^{55,184,185} y, al mismo tiempo, disminuye la frecuencia de las malformaciones cardíacas y de los arcos branquiales que presentan^{56,326}.

En cuanto a los receptores del AR (RARs), en los animales mutantes para la doble mezcla de algunos de sus genes, se reproduce fielmente el fenotipo de los animales descendientes de madres alimentadas con deficiencia de vitamina A junto a otras malformaciones, como HDC, truncus arterioso, defectos cardíacos conotruncuales, anomalías de los grandes vasos, timo ectópico o ausente, etc. Y lo que es más interesante, también presentan una hendidura traqueoesofágica común tapizada con un epitelio ciliado, malformaciones de los miembros y alteraciones renales, hallazgos que recuerdan a la asociación VACTERL y que son muy parecidos a los que tienen los embriones de rata tratados con adriamicina^{322,327}. Este modelo, por tanto, representa un punto de unión entre la HDC y la AE e ilustra cómo el progreso en campos básicos de la ciencia puede ayudar a la comprensión de la etiopatogenia de las malformaciones congénitas.

Hipótesis y Objetivos

1.- HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual:

La hernia diafragmática humana es una entidad clínica en la que el defecto anatómico por el que las vísceras se introducen en el tórax no se encuentra aislado. De hecho, son las malformaciones asociadas a este defecto las que condicionan en gran manera el pronóstico vital y funcional de los pacientes. En condiciones de laboratorio, el modelo experimental de hernia diafragmática congénita reproduce tanto el defecto herniario como gran parte de estas malformaciones asociadas, siendo por esta razón una excelente arma de estudio de esta enfermedad.

Muchas de estas malformaciones, tanto en humanos como en animales, se encuentran en estructuras derivadas de la cresta neural. Son muy frecuentes las alteraciones en el tracto de salida cardíaco y los grandes vasos, el tubo neural, los arcos faríngeos o las bolsas branquiales, así como la asociación a síndromes derivados de malformaciones en alguna de estas estructuras.

El seguimiento de los pacientes sobrevivientes a una hernia diafragmática nos enseña que el reflujo gastroesofágico es una secuela muy frecuente. De su estudio en humanos sabemos que existen en algunos casos alteraciones anatómicas esofágicas que podrían justificar este hallazgo. Hipotéticamente, estas alteraciones podrían estar causadas por una malformación en la innervación del esófago.

Esta innervación, tanto en su faceta extrínseca (nervios vagos) como intrínseca (plexos mientérico y submucoso) deriva íntegramente de la cresta neural. Dada la disponibilidad del modelo experimental, nuestra

hipótesis conceptual es por tanto que en condiciones de laboratorio la hernia diafragmática asocia también malformaciones de la innervación esofágica intrínseca y extrínseca, lo que constituiría una nueva prueba de una disregulación en la embriogénesis derivada de la cresta neural.

Hipótesis operativa:

En primer lugar, y en lo que respecta a la innervación extrínseca, los nervios vagos y los correspondientes recurrentes laríngeos, los fetos con hernia diafragmática congénita mostrarán alteraciones en su morfología o recorrido.

En segundo lugar, el plexo mientérico esofágico será anormal en los fetos de rata con hernia diafragmática congénita.

Hipótesis estadística:

1.- La hipótesis nula es que no existan alteraciones en la anatomía, morfología o recorrido de los nervios vagos y recurrentes laríngeos tanto en los fetos controles como en los que presenten hernia diafragmática congénita. La hipótesis alternativa es que los fetos con hernia muestren una alteración en esta innervación.

2.- La segunda hipótesis nula es que la innervación esofágica intrínseca (plexo mientérico) sea igual en los fetos controles y en los fetos con hernia diafragmática. La hipótesis alternativa es que el plexo mientérico de los fetos con hernia presente alteraciones medibles comparado con los controles.

2.- OBJETIVOS

1.- Demostrar que en la hernia diafragmática congénita experimental se producen malformaciones en la innervación esofágica extrínseca, es decir, en la anatomía de los nervios vago y recurrente laríngeo. Realizar un estudio descriptivo de dichas malformaciones comparándolas con la anatomía normal de los fetos controles.

2.- Estudiar si en la hernia diafragmática experimental existen además alteraciones en la estructura del plexo mientérico esofágico.

3.- Demostrar, si existiesen estas alteraciones en el plexo mientérico y usando métodos morfométricos reproducibles, que las medidas correspondientes de neuronas y ganglios se encuentran alteradas con relación a las medidas de embriones de rata controles.

Material y métodos

1. ANIMALES

Se emplearon ratas Sprague-Dawley hembras vírgenes de 220-250 gramos de peso y machos de fertilidad probada. Los animales fueron alojados en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Hospital La Paz de Madrid y fueron alimentados con el granulado especial para rata, y agua de bebida “ad libitum”. Su manipulación se ajustó a las exigencias de la Unión Europea vigentes (E.C. 86/L609) y a las recogidas en los R.D. 223/1988 y 1201/2005.

2.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

2.1.- GRUPOS EXPERIMENTALES

Se consideraron 2 grupos experimentales: Control y HDC. En cada uno de los grupos se incluyeron al menos 10 madres gestantes. Este número fue ampliado a medida que se realizaron los experimentos, hasta alcanzar la cantidad de fetos suficientes para los mismos. El porcentaje de fetos con HDC en cada camada alcanzó al menos el 50% con la dosis de teratógeno usada.

2.2.- PROCEDIMIENTO:

2.2.1.- Fecundación controlada:

Tras 24 horas de contacto visual y olfativo, las hembras fueron enjauladas con macho (3x1) para su fecundación durante una noche. El día 0 de la gestación fue contado a partir del momento en que en el frotis vaginal se demostró la presencia de espermatozoides (Figura 15).

2.2.2.- Administración del teratógeno nitrofen:

En el día 9,5 de gestación se administró a las madres del grupo HDC una dosis de 400 mg/Kg (usando una dilución de 100 mg del teratógeno por 1mL de aceite de oliva virgen) por vía intragástrica (gavaje) (Figura 16). Los animales del grupo Control fueron tratados de idéntica forma con el mismo volumen de excipiente.

2.2.3- Cesárea y obtención de los fetos:

Se practicó en el día 21 de la gestación (término 22 días) bajo anestesia general practicada con una mezcla de ketamina (80mg/kg), diacepam (10mg/kg) y atropina (0,01mg/kg) por vía intraperitoneal (Figura 17), usando el microscopio de microcirugía Leica Wild M65 (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suiza). Se extirparon ambos hemiúteros (Figuras 18 y 19) y se extrajeron los embriones dentro de las membranas (Figura 20). Los fetos fueron sacrificados inmediatamente tras cortar el cordón umbilical mediante inmersión en suero fisiológico.

Se usaron para cada grupo 10 fetos aleatoriamente elegidos de 5 camadas diferentes (2 fetos por cada camada). En el grupo HDC se escogieron tan solo aquellos fetos que presentaron una hernia diafragmática (siempre que fuesen más del 50% del total), descartando aquellos que no presentaron la malformación. La razón de descartar aquellos animales expuestos al teratógeno pero que no presentaban HDC ha sido ampliamente discutida en la bibliografía previa^{14,197,198,201,328} y es analizada con mayor profundidad en la Discusión.

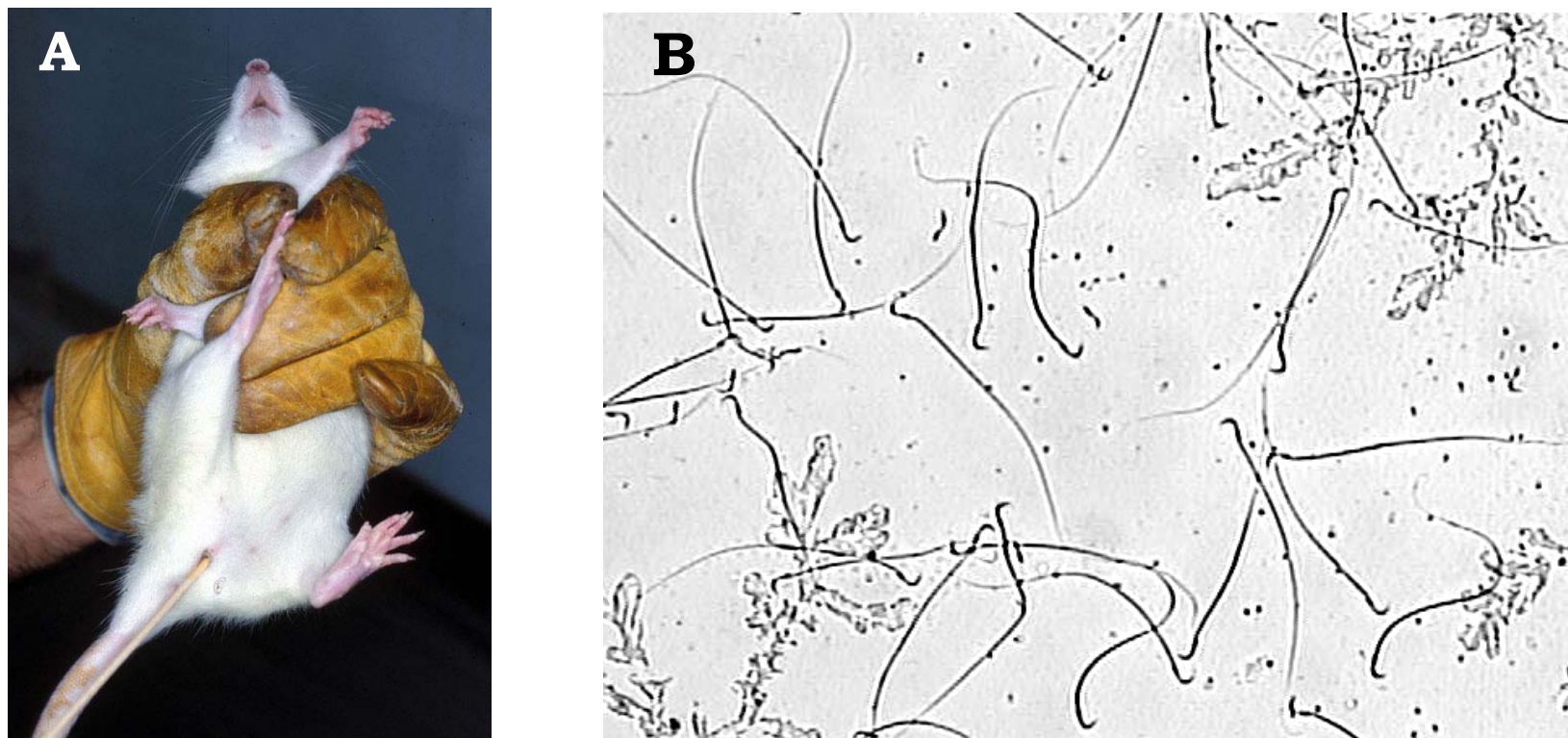


Figura 15: A) Frotis vaginal en la hembra de rata B) Resultado de frotis considerado positivo por la presencia de espermatozoides (magnificación original x200)



Figura 16: Administración del nitrofen mediante sondaje orogástrico previa anestesia del animal con Éter dietílico.

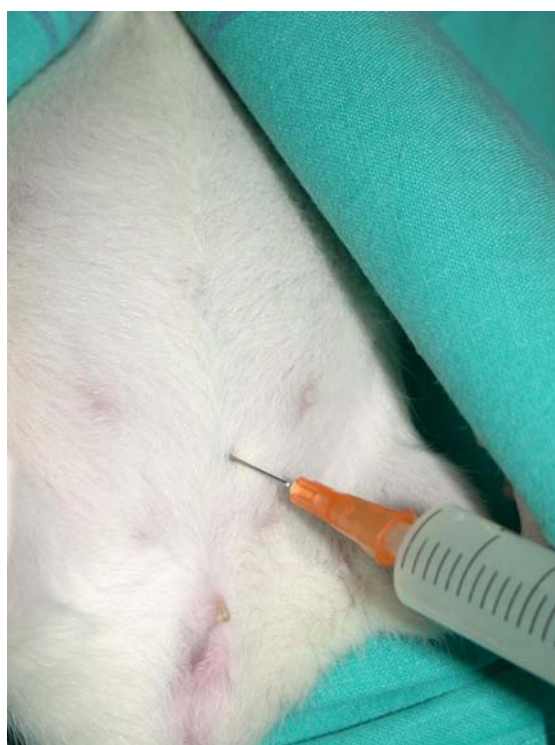


Figura 17: Anestesia general de la madre gestante previa a la cesárea mediante inyección intraperitoneal de ketamina, diacepam y atropina.

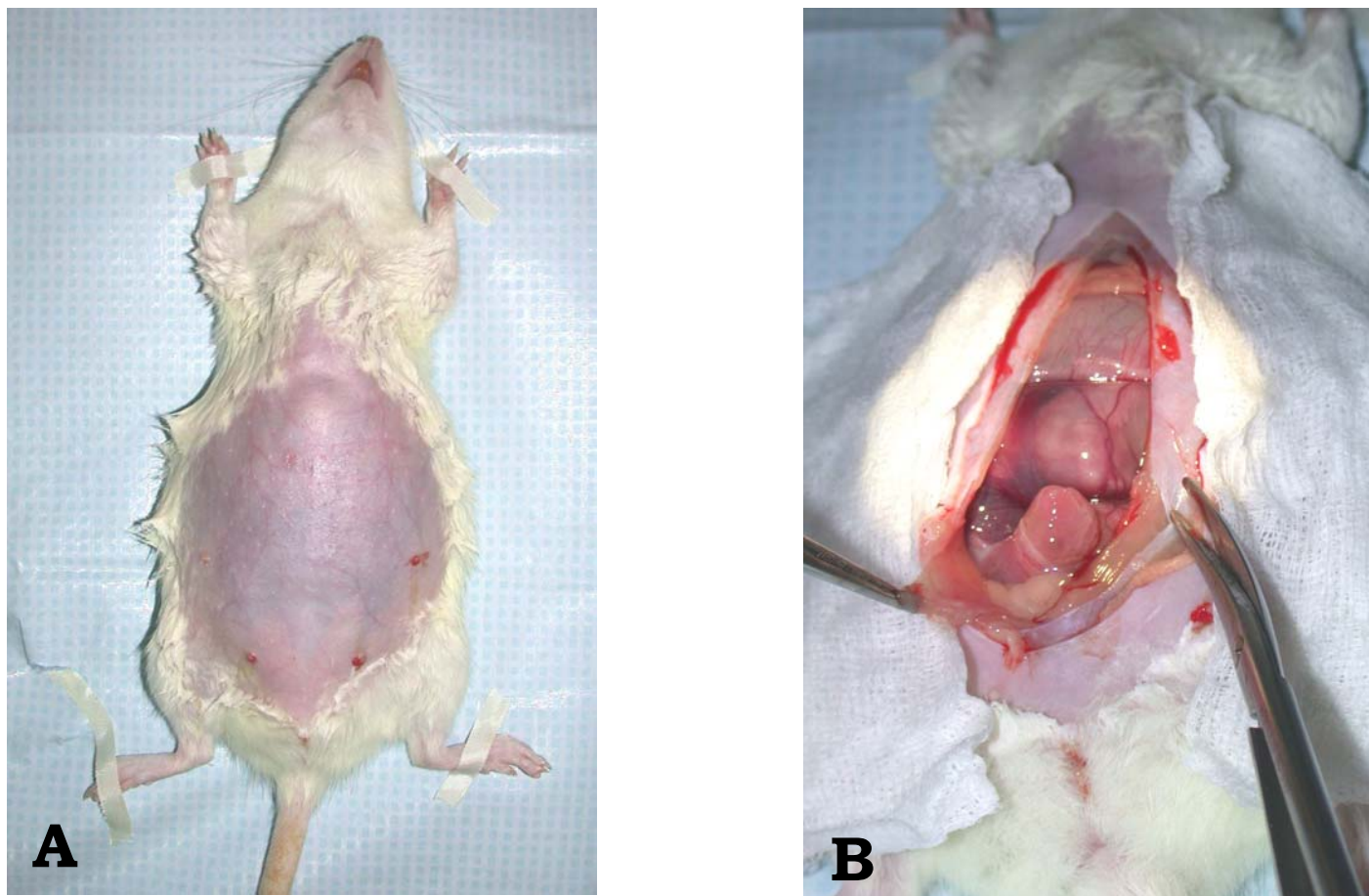


Figura 18: A) Preparación de la rata gestante para la cesárea, rasurando la zona de la laparotomía. B) Inicio de la laparotomía con técnica no estéril.

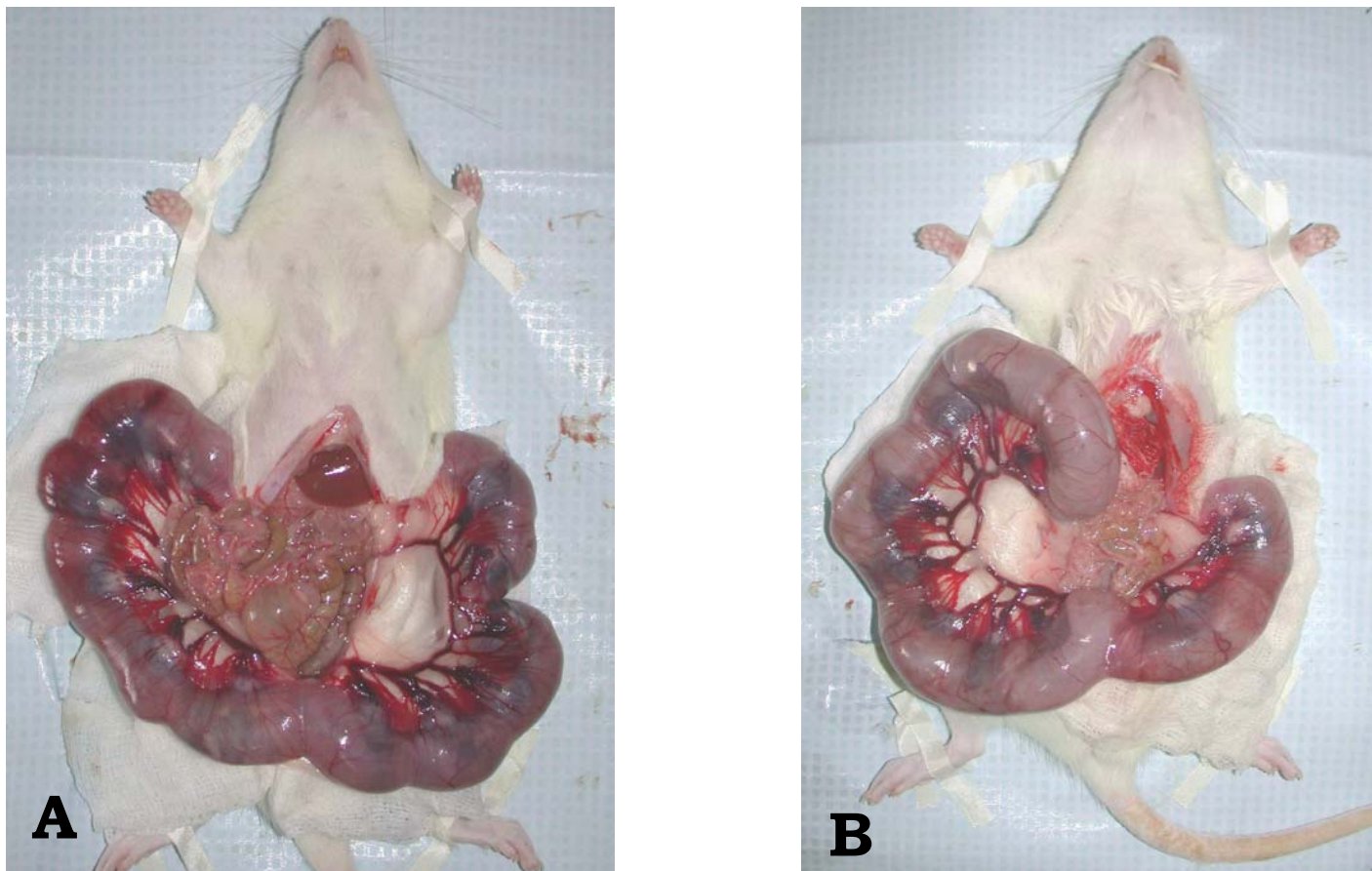


Figura 19: A) Exposición de los 2 hemiúteros con los fetos en su interior en una hembra del grupo control (A) y en otra del grupo HDC (B). La administración del teratógeno provoca, entre otras alteraciones, una disminución del número de fetos por camada, como es evidente en estas imágenes especialmente en el hemiútero izquierdo de la figura B.



Figura 20: Imagen de un feto de rata de 21 días de gestación extraído de sus membranas y en el que aún no se ha seccionado el cordón umbilical.

2.2.4.- Estudio de la innervación esofágica extrínseca:

Los fetos fueron fijados en formol al 10% durante 48-72 horas. Posteriormente se cortaron transversalmente desde el cuello a la parte superior del abdomen en un bloque que fue fijado en parafina (Figura 21).

Cada bloque fue seccionado en rodajas de un grosor de 5 μ m, montando uno de cada 10 cortes en cristales convencionales (BDH, España, ref 406/0178/00) y tiñéndolo con Hematoxilina y Eosina. Todos ellos fueron estudiados en sentido cefalocaudal desde el nivel cricoideo hasta la unión gastroesofágica, centrándonos en la situación y calibre de los nervios vagos y recurrentes laríngeos, así como de sus ramas.

Para el estudio y representación en tres dimensiones cada corte fue digitalizado con una cámara digital (CV-S3200, Jai Corporation, Yokohama, Japan) adaptada al microscopio (Olympus CX40, Hamburg, Germany). Posteriormente todas las imágenes fueron incluidas en el disco duro de un ordenador de mesa tipo PC con procesador Intel Pentium 4 (Intel Corp, Santa Clara, California, Estados Unidos) y 256MB de memoria RAM.

A continuación fueron exportadas a un programa específico para la reconstrucción de estructuras biológicas en 3 dimensiones (TDR-3dbase® versión 1.3, Hubrecht Laboratory, Utrecht, Holanda), gentilmente cedido por el Dr. F.J. Veerbek. Con la ayuda de una tableta gráfica modelo Genius NewSketch 1212 HR III (KYE Systems Corp, San Chung, Taipei Hsien, Taiwan) se trazaron, ya dentro del programa TDR-3dbase®, en cada una de las imágenes los contornos en distinto color de las

estructuras implicadas en el estudio, incluyendo la tráquea, el esófago, las grandes arterias y los nervios vago y recurrente laríngeo (Figuras 22 y 23).

Con estos trazados, el citado programa reconstruyó las imágenes en tres dimensiones de acuerdo a las separaciones de los cortes, obteniendo una representación gráfica móvil en los 3 ejes del espacio de forma que se pudo reconstruir tridimensionalmente un recorrido de estos nervios y sus relaciones anatómicas con los diversos órganos intratorácicos y cervicales. Este estudio fue realizado en los dos grupos experimentales.

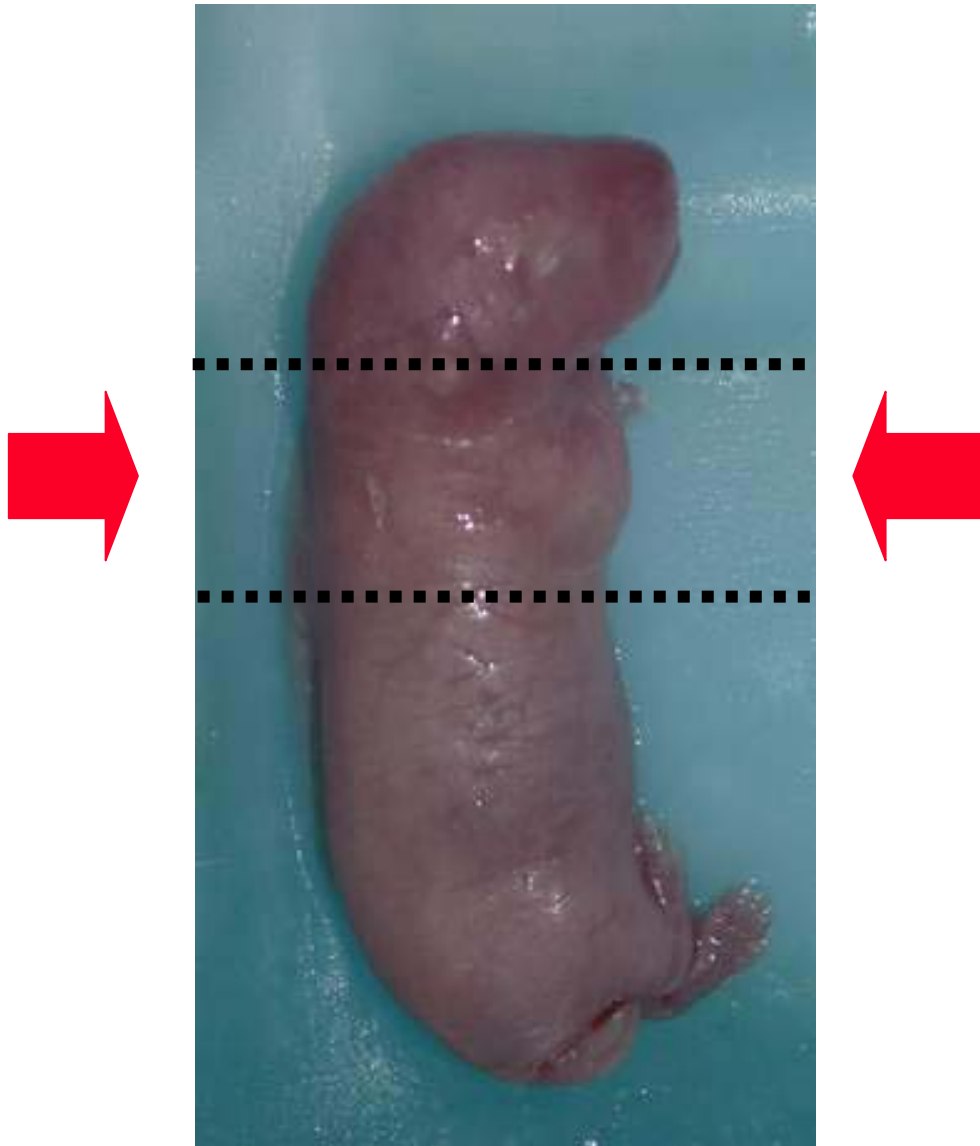


Figura 21: Representación esquemática del bloque extraído para el estudio de la inervación esofágica extrínseca, correspondiente al existente entre la laringe y la bifurcación traqueal.

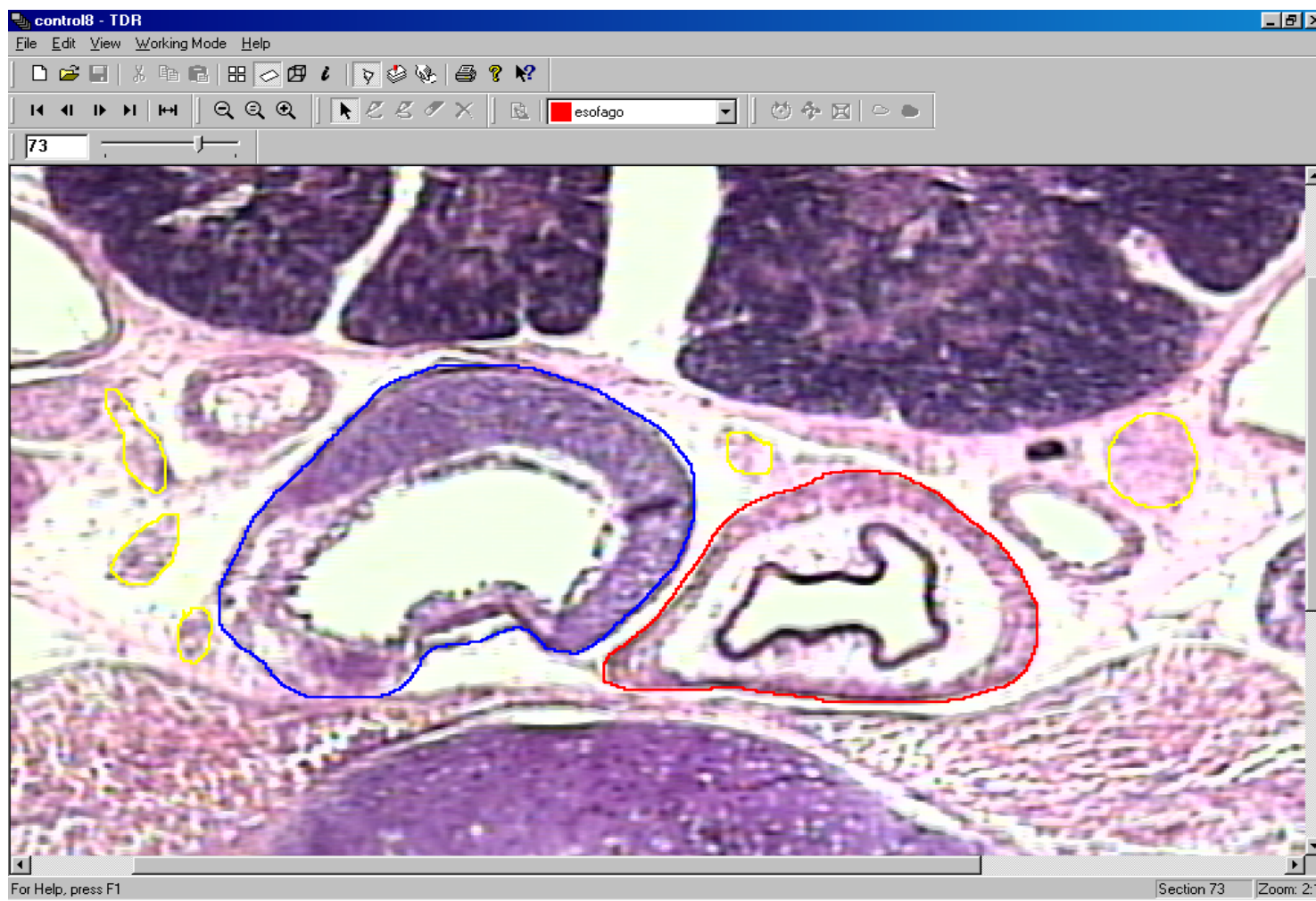


Figura 22: Captura de pantalla del programa TDR-3dbase® en el modo de imágenes individuales con un corte torácico alto. Gracias al uso de la tableta gráfica se han dibujado los contornos del esófago (rojo), traquea (azul) y nervios vago y recurrentes laríngeos (amarillo).

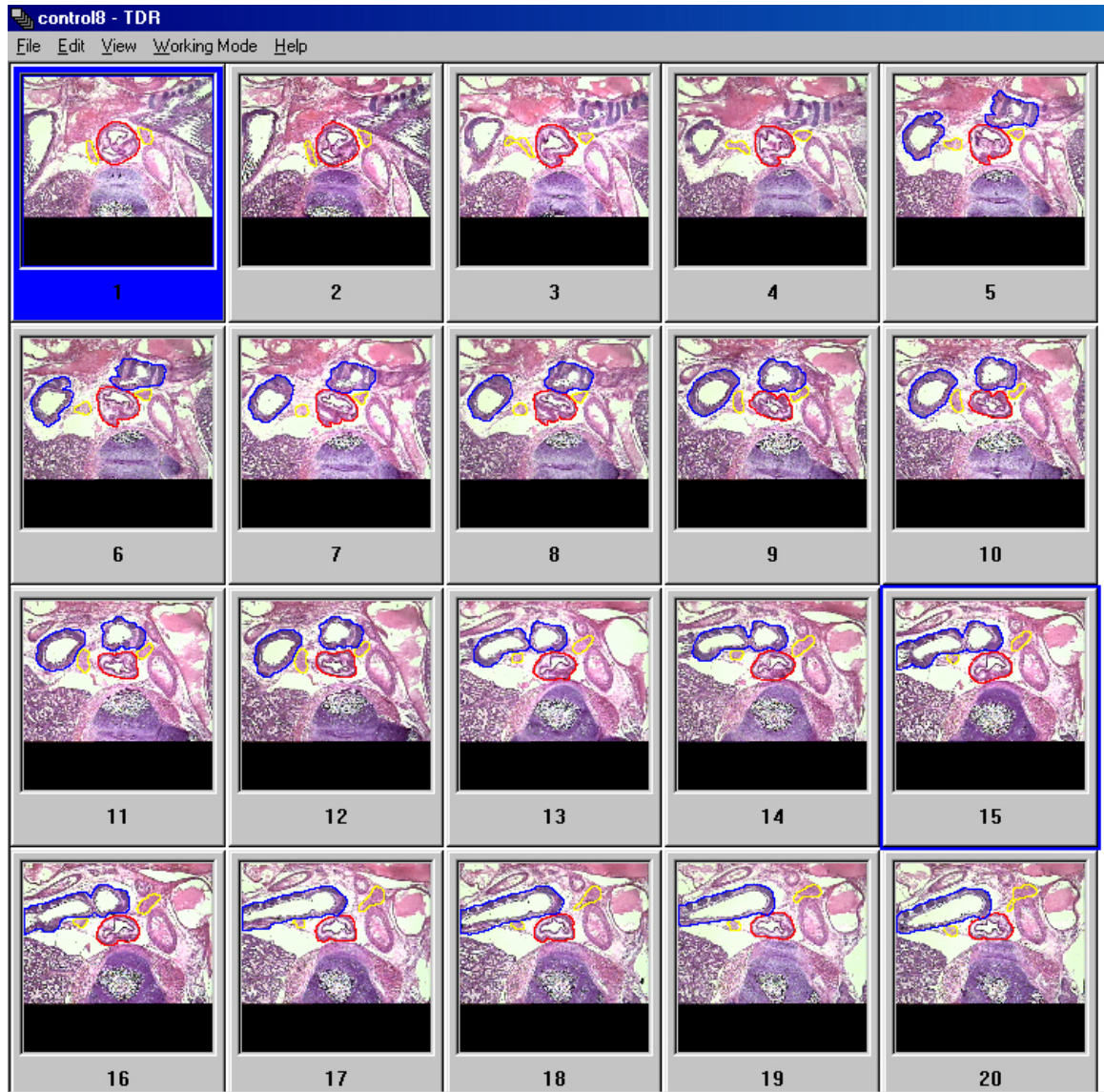


Figura 23: Captura de pantalla del programa TDR-3dbase® en el modo “todas las imágenes”. La pantalla muestra tan solo 20 de las 100 introducidas y en las que, en cada una, se realiza el dibujo del perfil de las estructuras (ver figura 19). En este caso se muestran de más distal (marcada en la imagen con el número 1) a más proximal (número 20). Se puede apreciar la bifurcación traqueal (en azul) y el inicio del nervio recurrente laríngeo izquierdo (en amarillo) por debajo de la aorta.

2.2.5.- Estudio de la innervación esofágica intrínseca:

2.2.5.1.- Estudio inmunohistoquímico en cortes esofágicos transversales:

Para el estudio de la presencia de tejido nervioso en el plexo mientérico, se practicaron inicialmente tinciones inmunohistoquímicas específicas para el tejido nervioso en cortes esofágicos transversales. En cada feto se disecó el esófago de los tejidos circundantes desde la faringe hasta la unión gastroesofágica, marcando con una pequeña lazada de un hilo de 7/0 el extremo distal del mismo. En algunos de los fetos con hernia diafragmática congénita se extrajo el esófago sin separarlo de la traquea, pues el cartílago de esta última sirvió frecuentemente como control de tinción. Tras ser fijados en formol al menos 24h, se obtuvo un bloque de parafina con 3 o más esófagos en posición vertical. Se tiñeron 2 cortes de la parte más proximal, otros dos de la porción media y otros 2 de la parte distal del esófago, todos ellos con un grosor de unas 3 micras, comprobando previa tinción con hematoxilina-eosina de una muestra control del corte inmediatamente anterior, la correcta disposición y orientación de los esófagos. Se obtuvieron igualmente cortes longitudinales aislados de algunos esófagos con objetivos meramente ilustrativos.

Una vez obtenidos los cortes y fijados en un cristal con xilano (Dako Ltd, Cambridgeshire, UK, ref S3003), fueron desparafinados con xilol (Sigma-Aldrich, Madrid, ref 95660) durante 10 minutos y posteriormente se hidrataron en alcoholes decrecientes desde absoluto hasta 70°. Para desenmascarar el antígeno se usó como potenciador una mezcla con un pH de 8,2 de agua destilada, EDTA (Sigma, España, ref 2606) y ácido clorhídrico, previamente llevada hasta ebullición. Los

cristales junto con esta solución fueron incubados en una estufa a 150°C durante 45 minutos, prolongando este tiempo si las muestras originales habían pasado más de una semana fijadas en formol.

Tras ser enfriadas bajo agua se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena (Dako, España, ref S2001) durante un tiempo de 10 minutos, pasados los cuales se lavaron los cristales con tampón Tris (Sigma-Aldrich, Madrid, ref 93391) a un pH de 7,4-7,6. A continuación se aplicaron los anticuerpos primarios a la dilución indicada por el laboratorio, incubándolos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los anticuerpos utilizados en este proceso fueron Enolasa Neuroespecífica (Dako Ltd, Cambridgeshire, UK, ref M0873), Proteína S-100 (Dako Ltd, Cambridgeshire, UK, ref A0384) y Neurofilamento (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, US, sc-32729). Una vez pasados los 30 minutos se lavaron de nuevo las muestras con tampón Tris.

Por último las muestras se incubaron otros 30 minutos con el anticuerpo secundario policlonal y, después de ser lavadas de nuevo con tampón Tris, se revelaron con diaminobencidina (Sigma-Aldrich, Madrid, ref 32741), mezclándola con el tampón correspondiente en la cantidad indicada y esperando como máximo 5 minutos. Al final, tras ser lavados de nuevo con tampón Tris y agua destilada, se sumergieron en hematoxilina durante 5 minutos para contrateñir el fondo, se deshidrataron en alcoholes crecientes desde 70 a 100°, se lavaron en xilol y se cubrieron con el cubreporta correspondiente usando DPX como medio de montaje (BDH, Poole, UK, ref 360294H).

Además de objetivar la presencia o no de ganglios o de células individuales positivas a la tinción, se contabilizaron manualmente

cuando la muestra lo permitía, el número de ganglios o nervios teñidos por corte esofágico completo. La ausencia de plexo submucoso en el ratón facilitó esta tarea. Ante la imposibilidad de contabilizar individualmente cuerpos celulares, se consideraron como ganglios cualquier agrupación uniforme de áreas de tinción, independientemente de su tamaño, siempre que estuvieran claramente separados de las áreas teñidas adyacentes, y que estuvieran localizados en el lugar correspondiente al plexo mientérico.

2.2.5.2.- Estudio histoquímico en esófagos completos o “whole-mount”:

Se recurrió a la técnica del aislamiento completo del plexo mientérico llamada en inglés “whole-mount”, para la visualización de las redes y conexiones nerviosas entre los distintos ganglios intramurales del esófago. Dicha técnica, descrita y desarrollada principalmente en el ámbito de la cirugía pediátrica por el grupo de Dublín, Irlanda, permite el análisis del tejido nervioso en toda su extensión longitudinal dentro de un segmento concreto de tejido. Facilita la comprensión de la anatomía total, pues permite la visualización completa de los ganglios nerviosos y de las interconexiones entre ellos. Su inconveniente principal es la dificultad técnica que implica en tejidos de pequeño tamaño y frágiles de manipular. Para realizarla, una vez aislados los esófagos con la técnica habitual fueron preservados en paraformaldehído al 4% durante al menos 4 horas a 4°C en oscuridad. Dicha solución es un líquido fijador y preservador que no afecta a la capacidad del tejido nervioso para captar anticuerpos específicos, razón por la que es preferible al formol o formalina clásicos usados para preservación de muestras biológicas.

Tras la fijación se sustituyó el paraformaldehído por PBS. La separación de las capas musculares y la mucosa junto a la submucosa se hizo con ayuda del microscopio estereoscópico o lupa binocular para microcirugía (Leica MS5, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suiza). A continuación se abrió longitudinalmente el esófago con ayuda de tijera microquirúrgica, retirando con cuidado extremo la capa mucosa en finas tiras en sentido proximal a distal, dejando tan solo indemne la capa correspondiente a la muscular y el plexo mientérico, que fue la procesada, pues anatómicamente no existe en el esófago del roedor plexo nervioso submucoso.

Utilizamos tinciones histoquímicas con Acetil-Colinesterasa por ser más específica y fácil de programar en poco tiempo, obteniendo así una visión real de la red neuronal existente. Para esta tinción se usó una mezcla de los siguientes compuestos:

- Acetil-tiocolina iodada (Sigma, España, A5751), 250 mg.
- Tampón acetato a pH 6,0 325 mL. Consiste en una mezcla de 2,1 mL de ácido acético 0,2M (Fuka, Tallaght, Irlanda, ref 74030) y acetato de sodio 0,2M (BDH AnalR, España, ref 10236)
- Citrato de sodio (Sigma, España, ref S-4641) 0,73525 g.
- Sulfato de cobre (BDH GPR, España, ref 27850) 0,2394 g.
- Agua destilada 50 mL.

- Tetraisopropil pirofosforamida (Sigma, España, ref T1505), 10 mL, que es sustituible, si no se encuentra o su manipulación se descarta por su toxicidad, por la misma cantidad de agua destilada.

- Ferricianida potásica (Sigma-Aldrich, España, ref P-8131) 0,0823 g.

Una vez obtenida la solución, se cubrieron con ella las muestras intestinales y se incubaron durante 1 hora a 37°C, observando la coloración de la muestra bajo microscopio o lupa quirúrgica. Cuando la tinción se consideró positiva, se sustituyó el líquido que contenía la acetil-colinesterasa por PBS y se dio por concluida la técnica. Si no existía tinción o era débil, se dejaron las muestras en frigorífico por espacio de 2 a 12h hasta revisar el resultado.

En todos los casos, el proceso finalizó colocando las muestras ya teñidas en portas normales y cubriéndolas con cubreportas usando Glycergel (Dako, España, ref C-0563) como fijador.

2.2.5.3.- Evaluación cuantitativa del número de células:

Para la estimación cuantitativa del número de células nerviosas por sección esofágica usando un software específico de análisis de imágenes histológicas (Image Pro-plus, Media Cybernetics, U.S.A.), considerando positivas las células teñidas con el anticuerpo correspondiente.

2.2.5.4.- Evaluación semi-cuantitativa de los plexos nerviosos:

Las técnicas de *whole mount* no permiten una estimación cuantitativa dadas las características de su obtención. Sin embargo sí es posible una estimación semi-cuantitativa y el análisis de determinados parámetros usando también para ello el *software* específico de análisis de imágenes histológicas. Dichos parámetros fueron los siguientes:

- 1.- Número de ganglios por campo de gran aumento.
- 2.- Área media de los ganglios.
- 3.- Área parcial de los ganglios respecto al área esofágica total, es decir la cantidad proporcional de tejido nervioso en el área total del esófago.

3.- METODOS ESTADISTICOS:

Las variables numéricas de cada grupo fueron tratadas estadísticamente por métodos descriptivos convencionales. La comparación de medias entre grupos se realizó por métodos no paramétricos dado el tamaño de las muestras previstas (Kruskall-Wallis para más de dos grupos y Mann-Whitney para dos grupos). Si los tamaños muestrales, la homogeneidad de los datos y el ajuste a la normalidad de la distribución lo justificaron, se usaron métodos paramétricos (ANOVA para más de dos grupos y “t” de

Student para dos grupos). Los datos fueron almacenados en la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office 2000, Microsoft Ibérica, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España) y procesados mediante el paquete estadístico StatView 4.53 para Windows (Abacus Concepts Inc, Londres, Reino Unido). La hipótesis nula se rechazó si las diferencias entre grupos fueron mayores del 5% ($p < 0,05$). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar.

Resultados

1.- INERVACION ESOFAGICA EXTRÍNSECA: NERVIOS VAGOS Y RECURRENTE LARÍNGEOS

1.1.- OBTENCIÓN DE LOS EMBRIONES, PESO Y SUJETOS DEL ESTUDIO:

Se incluyeron en el estudio 4 ratas gestantes del grupo Control y otras 8 del grupo HDC. Se obtuvieron un total de 110 fetos en las 12 camadas, con un peso medio de $5,334 \pm 0,82$ vs $4,7554 \pm 0,36$ (control vs HDC, $p < 0,05$) (Figura 24). En los 45 animales del grupo Control no se objetivó ninguna malformación diafragmática, mientras que 50 de los 65 fetos del grupo HDC (76,9%) presentaron una hernia diafragmática izquierda. Para el estudio de la anatomía de los nervios vagos y recurrentes laríngeos se escogieron aleatoriamente 9 fetos control y 9 fetos con HDC.

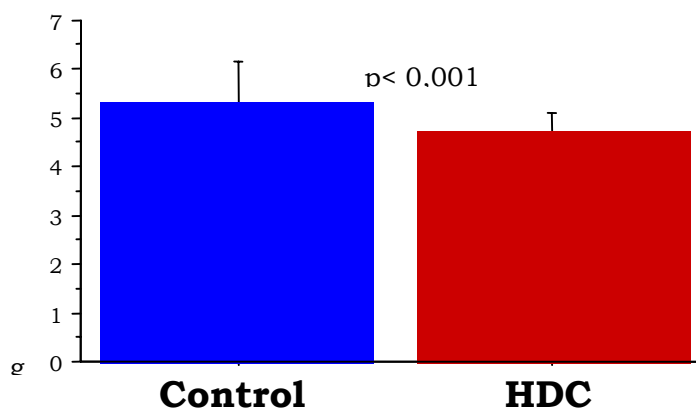


Figura 24: Tabla que muestra la media y la desviación estándar del peso de los fetos de los 2 grupos experimentales.

1.2.- ANATOMÍA DE LA INERVACIÓN ESOFÁGICA EXTRÍNSECA EN EL GRUPO CONTROL:

La anatomía de los nervios vago y recurrente laríngeo en el grupo Control sigue con exactitud la descrita por Qi¹⁷⁷ en el estudio del modelo experimental de atresia de esófago inducida con Adriamicina, y remeda fielmente la conocida en el ser humano.

En la porción más distal del esófago ambos nervios vagos descienden a ambos lados del esófago en íntimo contacto con él. El nervio vago derecho (NVD) tiende a hacerse más posterior desde la bifurcación traqueal, mientras que el izquierdo (NVI) conserva su posición hasta la entrada al abdomen. En los 2, a veces, se observan numerosas ramas que dan lugar a un complejo plexo nervioso a nivel del cardias (Figuras 25 y 26).

En sentido más proximal, el nervio recurrente laríngeo izquierdo (NRLI) se origina del NVI cercano a la pared de la aorta, cruzando bajo el arco aórtico para ascender hacia la laringe a lo largo de la hendidura traqueoesofágica; tanto este NRLI como el derecho a veces se encuentran divididos en varias ramas ya casi desde su salida. El NVD a este nivel desciende habitualmente pegado a la pared posterior de la traquea cerca de la hendidura traqueoesofágica derecha (Figuras 27 y 28).

En el otro lado, el nervio recurrente laríngeo derecho (NRLD) se origina del NVD aproximadamente al nivel de la arteria subclavia, ascendiendo a la laringe a lo largo del surco traqueoesofágico derecho o cerca de él (Figuras 29 y 30).

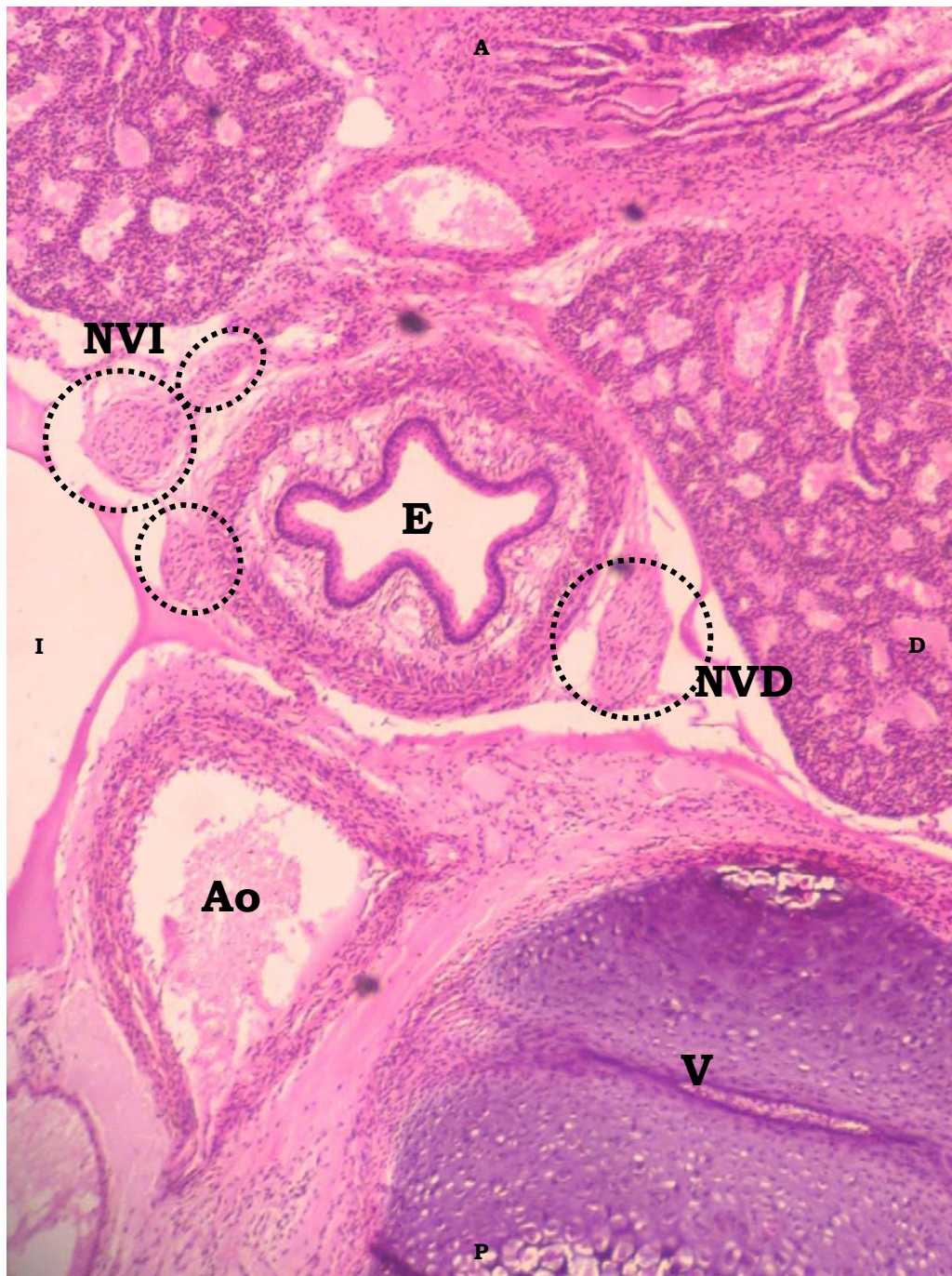


Figura 25: Corte transversal torácico bajo de un feto control mostrando la anatomía regional. El nervio vago derecho (NVD) camina junto al esófago (E) más posterior que el izquierdo (NVI), que a su vez ya está dividido en varias ramas. V: Vértebra, Ao: Aorta, I: Izquierda, D:Derecha. Magnificación original x100.

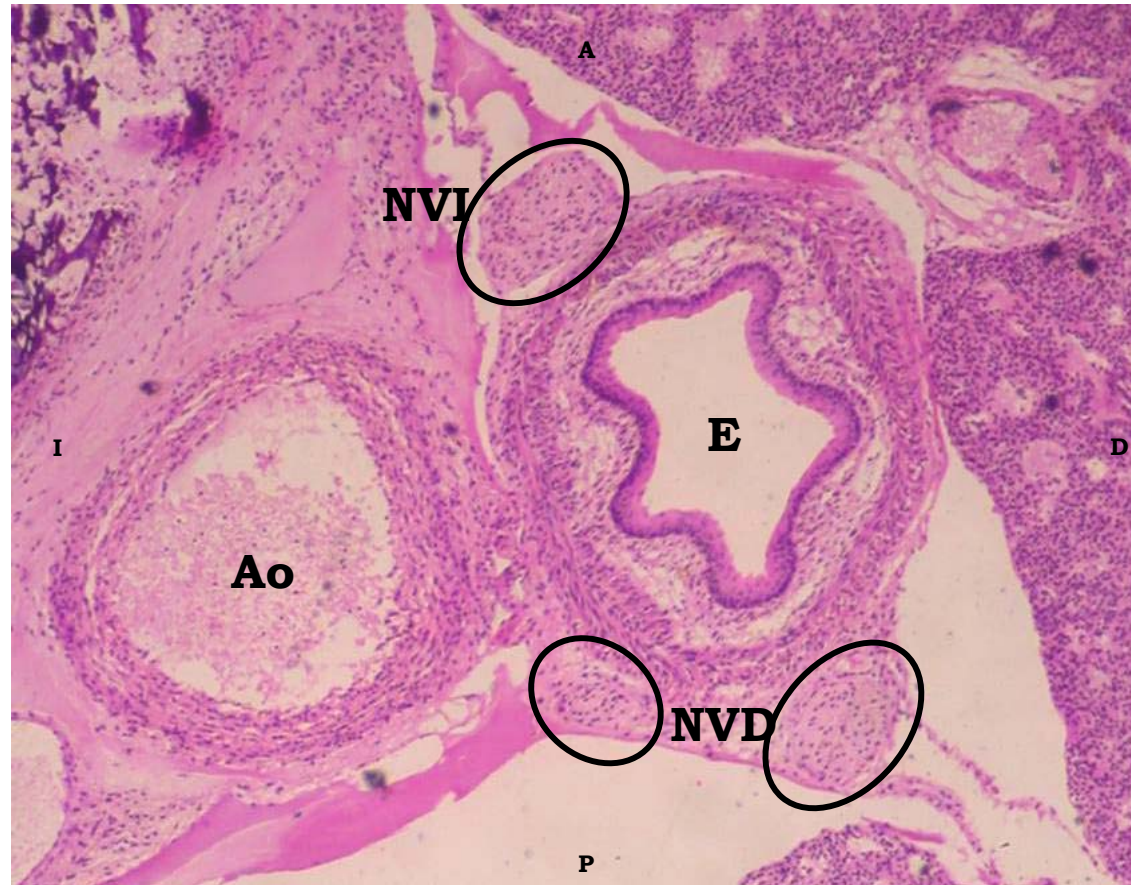


Figura 26: Corte transversal torácico bajo de un feto control mostrando la anatomía regional. Como en la figura anterior, El nervio vago derecho (NVD) y una de sus ramificaciones, camina junto al esófago (E) más posterior que el izquierdo (NVI). Ao:Aorta, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.

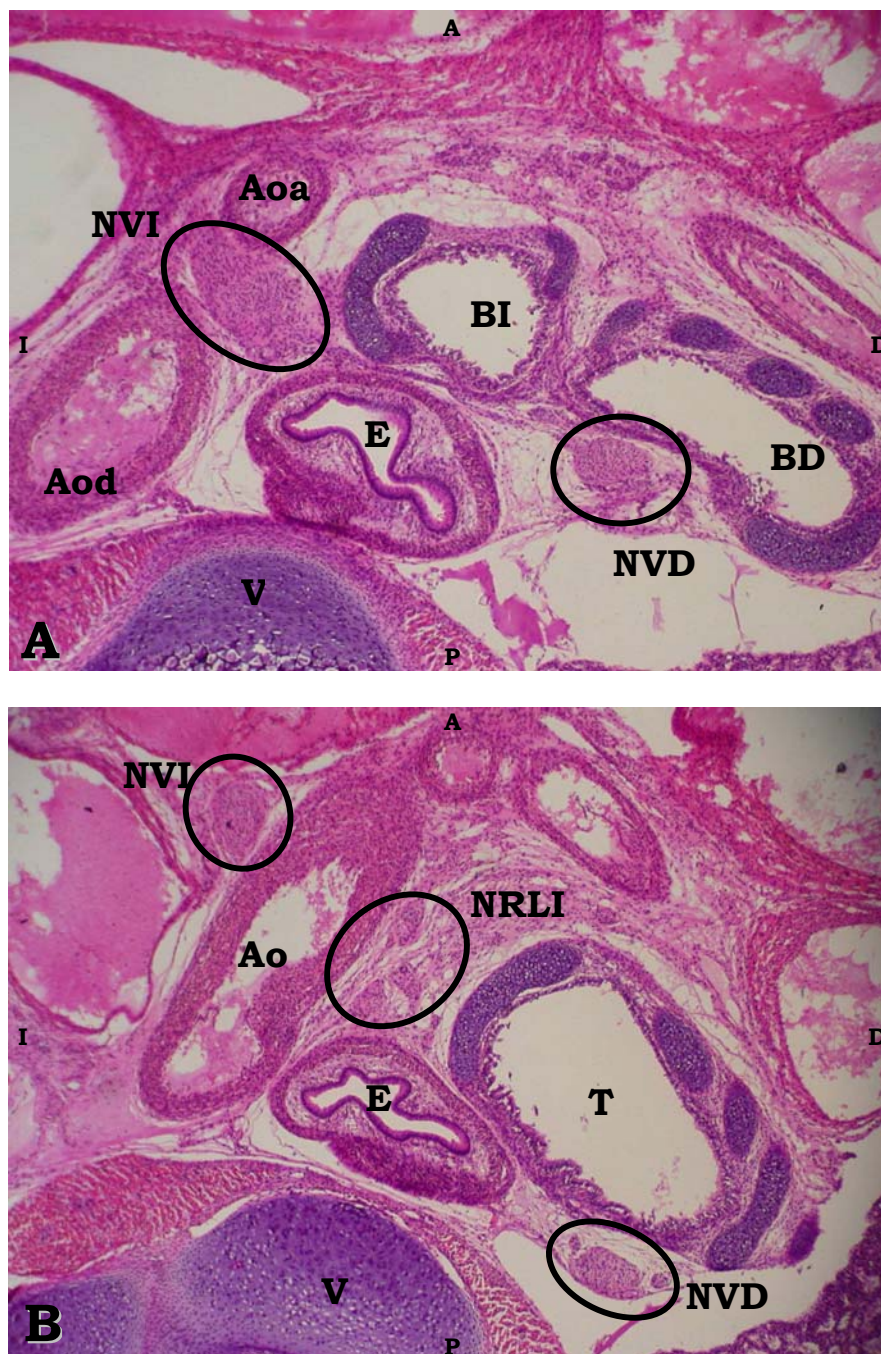


Figura 27: Dos imágenes de un mismo feto control que muestran la salida del nervio recurrente laríngeo izquierdo (NRLI) y sus relaciones anatómicas. A) Por debajo del cayado de la aorta el NVI muestra un engrosamiento que corresponde a la salida del NRLI. A este nivel la vía respiratoria ya está bifurcada. B) Un poco más arriba se ha hecho patente la división de los NVI y NRLI, que a su vez está subdividido en varias ramas. Ao:Aorta, Aoa:Aorta ascendente, Aod:Aorta descendente, BD:Bronquio principal derecho, BI:Bronquio principal izquierdo, E: Esófago, V: Vértebra, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.

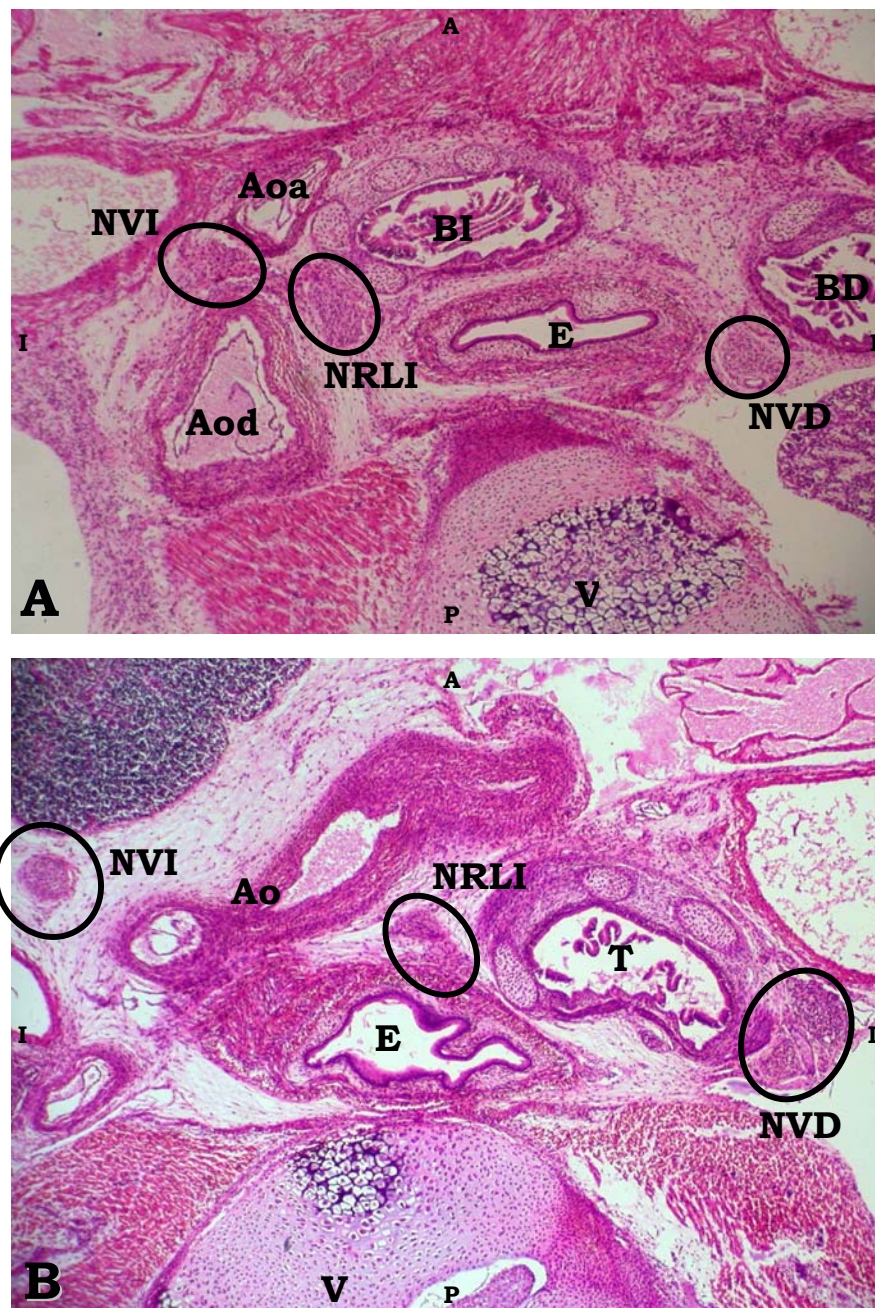


Figura 28: Imágenes de 2 fetos del grupo control que permiten confirmar la anatomía normal del NRLI y del NVD a nivel torácico medio (aproximadamente en la bifurcación traqueal). A) NVI y NRLI inmediatamente tras su salida bajo el cayado de la aorta. B) Un poco más arriba los 2 nervios caminan ya muy alejados uno del otro. Ao:Aorta, Aoa:Aorta ascendente, Aod:Aorta descendente, BD:Bronquio principal derecho, BI:Bronquio principal izquierdo, E: Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.

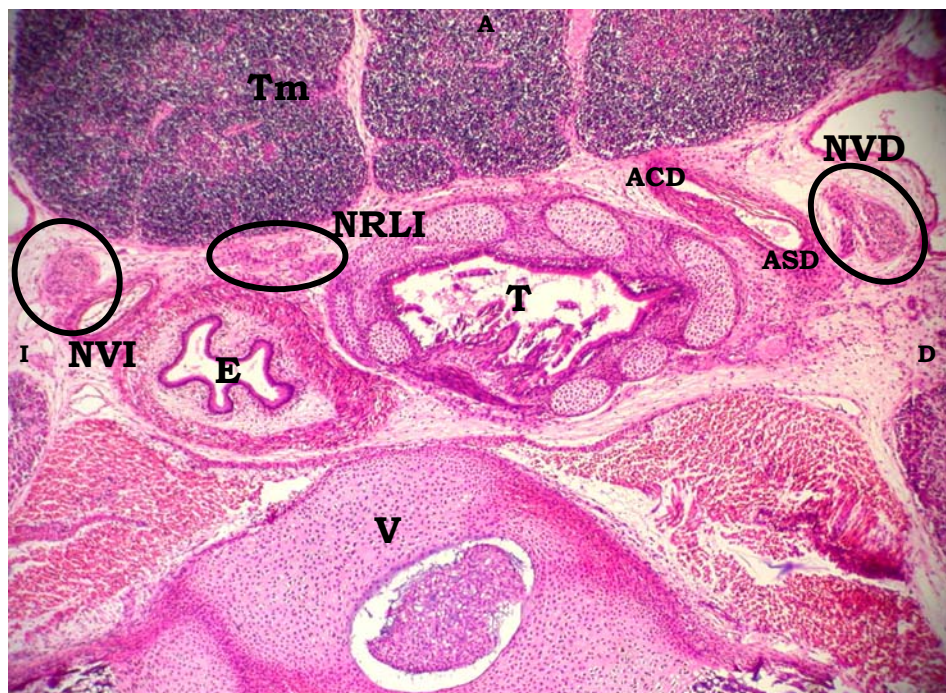


Figura 29: A nivel cervical, la salida del NRLD ocurre a nivel de la bifurcación de la arteria carótida derecha (ACD) y la arteria subclavia (ASD). En la imagen se muestra el inicio de esta salida, con el NVD ya dividido en las ramas que darán lugar al NRLD. E: Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, Tm: Timo, D: Derecha, I: Izquierda, A: Anterior, P: Posterior. Magnificación original x100.

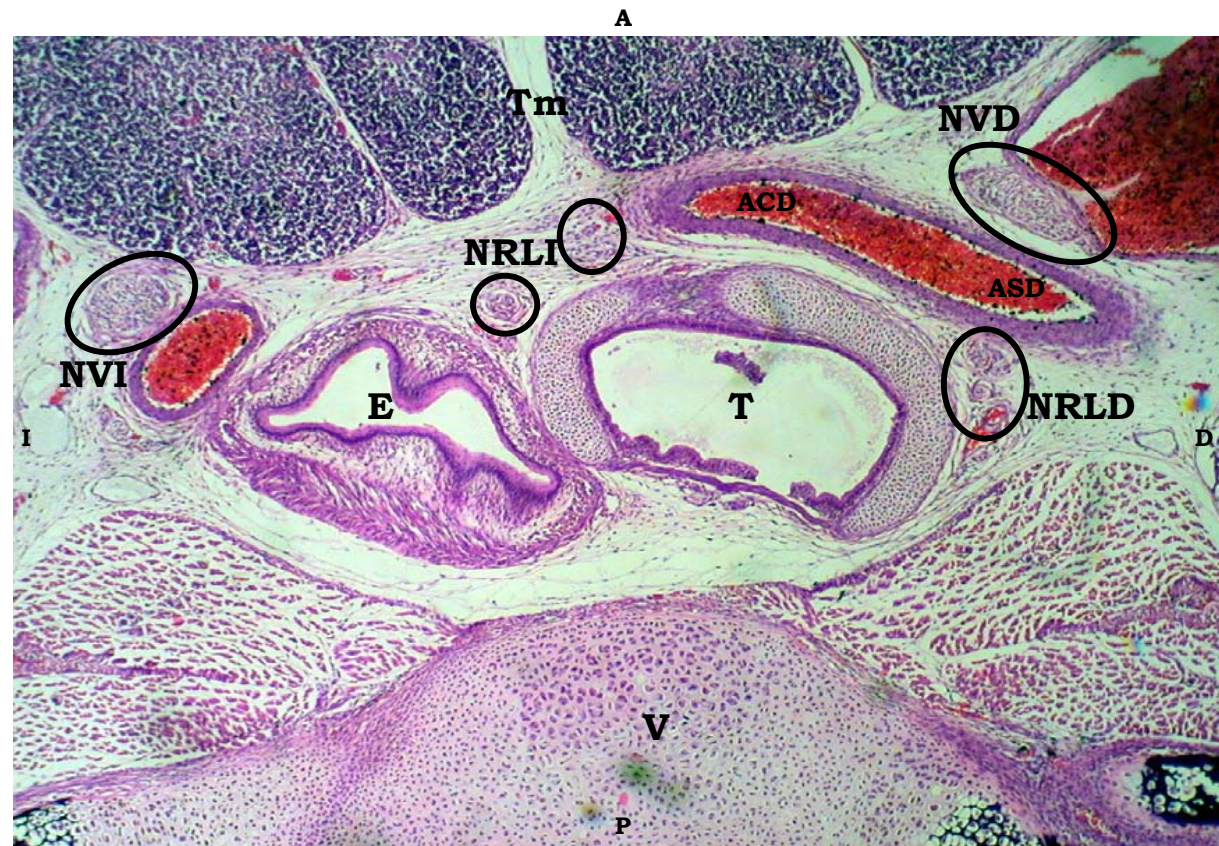


Figura 30: Un poco más arriba, el NRLD ya ha salido del NVD, caminando inicialmente pegado a la pared lateral de la tráquea. ACD: Arteria carótida derecha, ASD: Arteria subclavia derecha, E: Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, Tm: Timo, D: Derecha, I: Izquierda, A: Anterior, P: Posterior. Magnificación original x100.

1.3.- ANATOMÍA DE LA INERVACIÓN ESOFÁGICA EXTRÍNSECA EN EL GRUPO HDC:

Comparados con los fetos del grupo Control, los nervios de los fetos del grupo HDC mostraban alteraciones anatómicas importantes en 7 de los 9 casos. Estos hallazgos se encuentran resumidos en la Tabla II y pueden ser descritos como sigue:

a) Ausencia de uno de los troncos vagales: Cuatro animales carecían de uno de los vagos, en 2 casos el izquierdo y en otros 2 el derecho (Figuras 31 y 32). Estos 4 fetos, además, pertenecían a 4 camadas diferentes. Curiosamente, los 2 fetos con agenesia del NVI y uno de los que presentaba ausencia del NVD tenían, además, una arteria subclavia derecha (ASD) retroesofágica, hallazgo frecuente en el modelo experimental de HDC inducida con nitrofen y en los humanos con esta malformación (Figuras 33 y 34)¹⁴. En un caso, el NVD era aparentemente normal en la parte superior del tórax, pero progresivamente se hacía más fino en sentido distal hasta desaparecer en la parte más distal del esófago. En total, de los 4 paquetes vagales restantes de estos 4 fetos, tan solo 2 eran aparentemente normales. Los otros 2, aun existiendo, presentaban como anomalía la ausencia del correspondiente nervio recurrente laríngeo, y son presentados en el apartado siguiente.

b) Ausencia de uno de los 2 nervios recurrentes laríngeos: Como era esperable, aquellos fetos que presentaban agenesia de uno de los dos nervios vagos también carecían de su correspondiente nervio recurrente. Sin embargo, en 2 fetos que tenían un NVI o un NVD normales, también estaban ausentes los recurrentes izquierdo o derecho respectivamente (Figuras 35 a 38).

c) Hipoplasia nerviosa: Comparados con los fetos del grupo Control y también con los otros 7 del grupo HDC, 2 animales con HDC tenían troncos nerviosos considerablemente más pequeños. En estos animales la anatomía de la inervación esofágica extrínseca era, por lo demás, absolutamente normal (Figura 39).

d) Desviación del trayecto normal y cambio en las relaciones anatómicas en el mediastino: Dos de los 9 fetos estudiados tenían desviaciones leves pero evidentes del trayecto de los troncos nerviosos. En un caso el NRLD ascendía hacia el cuello delante de la tráquea. En otro feto el NVI descendía hacia el abdomen muy lejos del esófago, aunque este hallazgo pueda explicarse por la presencia de HDC en ese lado (Figura 40).

Tabla II: Malformaciones en los troncos nerviosos torácicos en 7 de los fetos con HDC

	NVI	NRLI	NVD	NRLD	ASD	Otros
#1	-	-	+	-	Aberrante	
#2	+	-	-	-	Aberrante	
#3	+	+	-	-	Normal	
#4	-	-	+	+	Aberrante	
#5	+	+	+	+	Normal	Hipoplasia Desviación
#6	+	+	+	+	Normal	Hipoplasia
#7	+	+	+	+	Normal	Desviación

NVI: Nervio vago izquierdo, NRLI: Nervio recurrente laríngeo izquierdo, NVD: Nervio vago derecho, NRLD: Nervio recurrente laríngeo derecho, ASD: Arteria subclavia derecha, +: Presente, -: Ausente.



Figura 29: Corte transversal de un feto del grupo HDC a nivel torácico bajo, que muestra una agenesia del NVI.
NVD: Nervio vago derecho, E: Esófago, Ao:Aorta, V: Vértebra, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior.
Magnificación original x 100.



Figura 32: Corte transversal de un feto del grupo HDC a nivel de la bifurcación bronquial, que muestra una agenesia del NVI. NVD: Nervio vago derecho, E: Esófago, Ao:Aorta, V: Vértebra, BD: Bronquio principal derecho, BI: Bronquio principal izquierdo, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior.Magnificación originalx100.

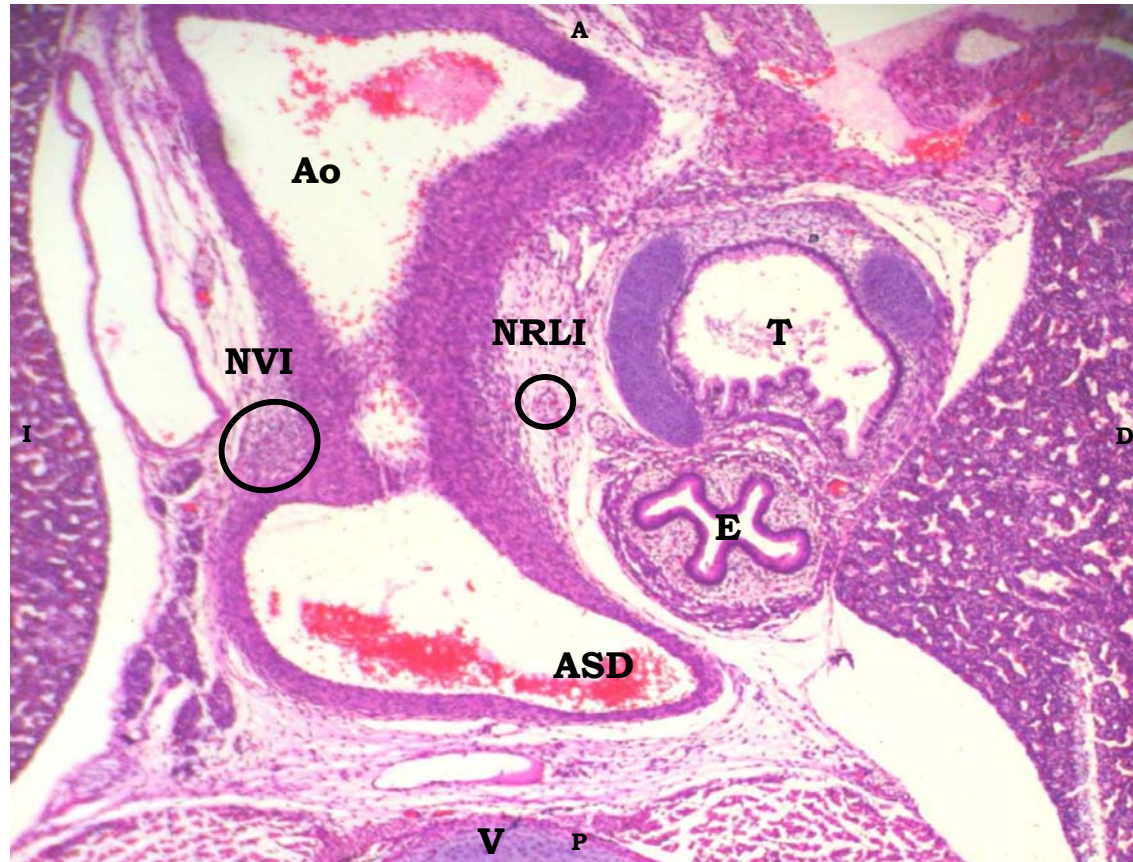


Figura 33: Sección transversal torácica alta que muestra una agenesia de NVD y la presencia de una ASD retroesofágica aberrante. NVI: Nervio vago izquierdo, NRLI: Nervio recurrente laríngeo izquierdo, ASD: Arteria subclavia derecha, E: Esófago, Ao:Aorta, V: Vértebra, T: Tráquea, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.

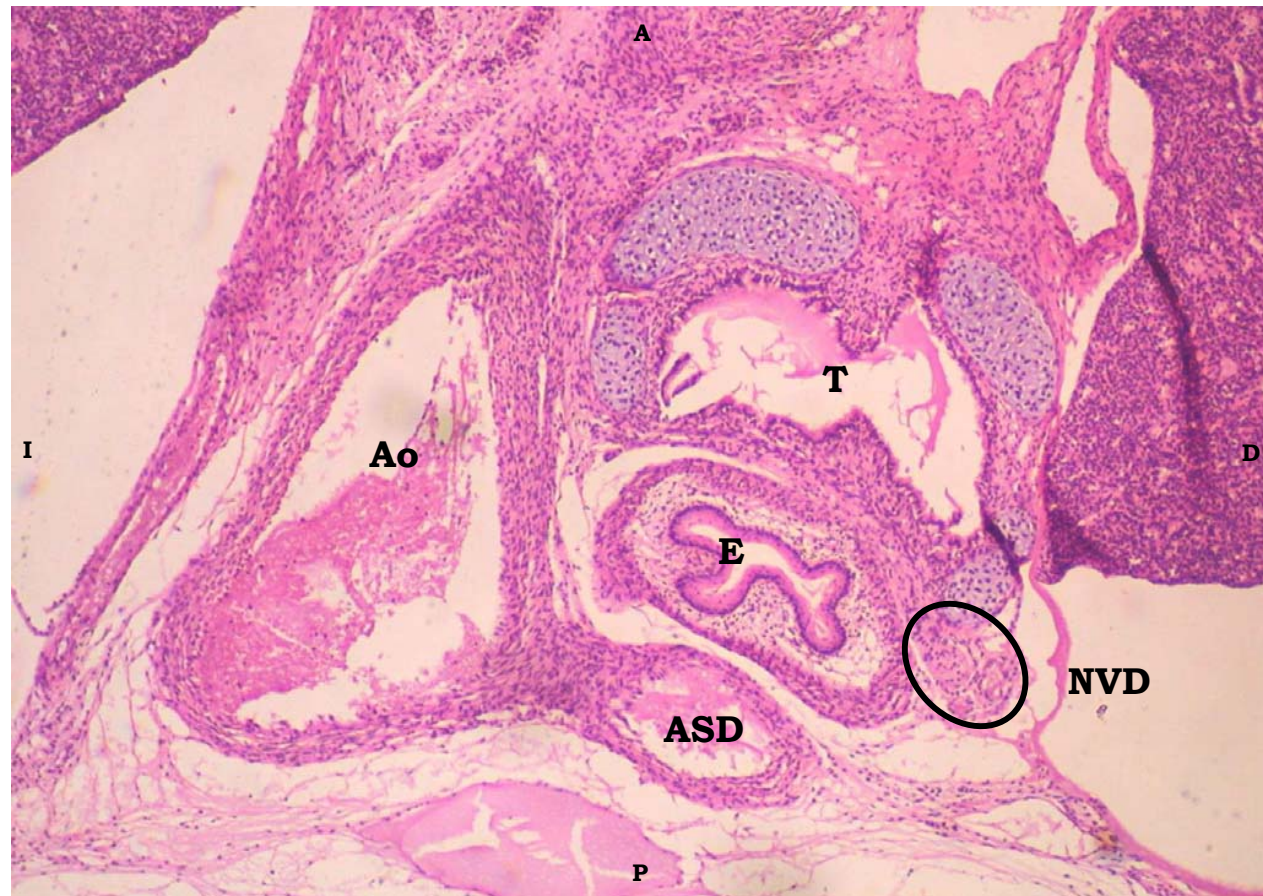


Figura 34: Como en el caso anterior, corte torácico alto que ahora muestra una agenesia de NVI y NRLI además de una ASD retroesofágica aberrante. NVD: Nervio vago derecho, Ao: Aorta, ASD: Arteria subclavia derecha, E: Esófago, Ao:Aorta, T: Tráquea, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación originalx100.

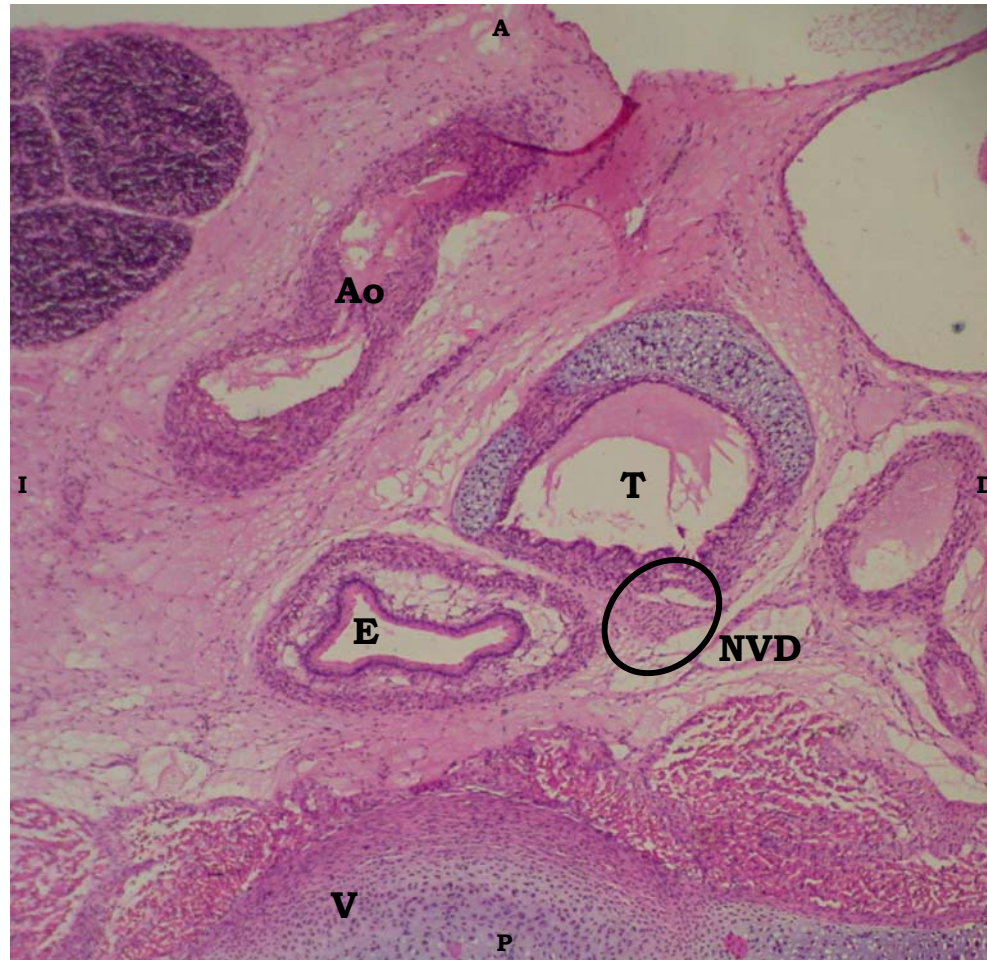


Figura 35: Ausencia de NVI y de NRLI. NVD: Nervio vago derecho, Ao: Aorta, E: Esófago, Ao:Aorta, T: Tráquea, V: Vértebra. D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.



Figura 36: Corte algo más superior del mismo animal de la Figura 33. Ausencia de NVI y de NRLL. NVD: Nervio vago derecho, Ao: Aorta, E: Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, D: Derecha, I: Izquierda, A: Anterior, P: Posterior. Magnificación original x100.



Figura 37: Sección cervical en un feto con HDC que muestra una agenesia del NVD y su correspondiente NRLD. NVI: Nervio vago izquierdo, NRLI: Nervio recurrente laríngeo izquierdo, E: Esófago, T: Tráquea, V:Vértebra, Tm:Timo, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.



Figura 38: Sección cervical que muestra en este feto la agenesia del NVD y de su correspondiente NRLD. NVI: Nervio vago izquierdo, NRLI: Nervio recurrente laríngeo izquierdo, E: Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.

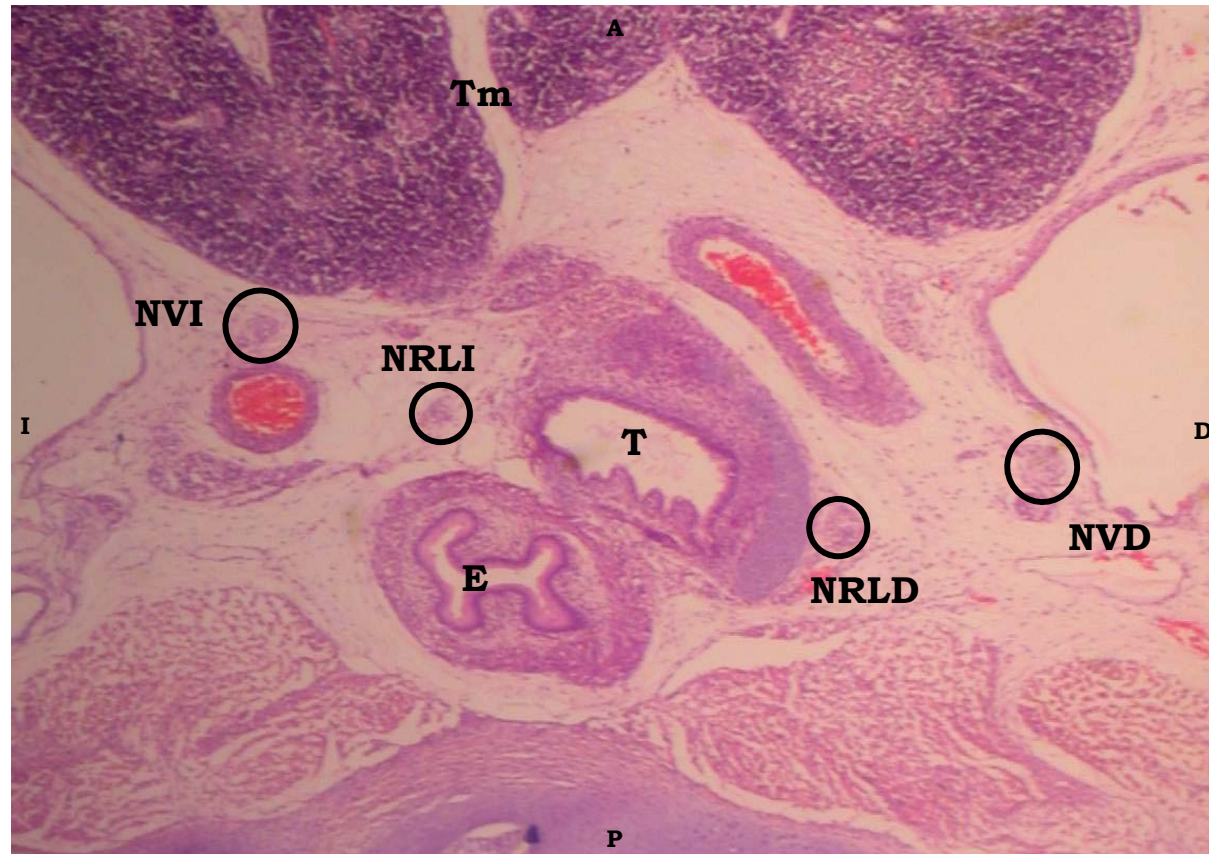


Figura 39: Corte cervical alto en un feto con HDC y presencia de los 2 vagos y los 2 recurrentes laríngeos. Sin embargo su tamaño es considerablemente menor comparado al de los otros animales de su grupo y al de los Controles. NVI: Nervio vago izquierdo, NRLI: Nervio recurrente laríngeo izquierdo, NVD: Nervio vago derecho, NRLD: Nervio recurrente laríngeo derecho, E: Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, Tm: Timo, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior.
Magnificación original x100.

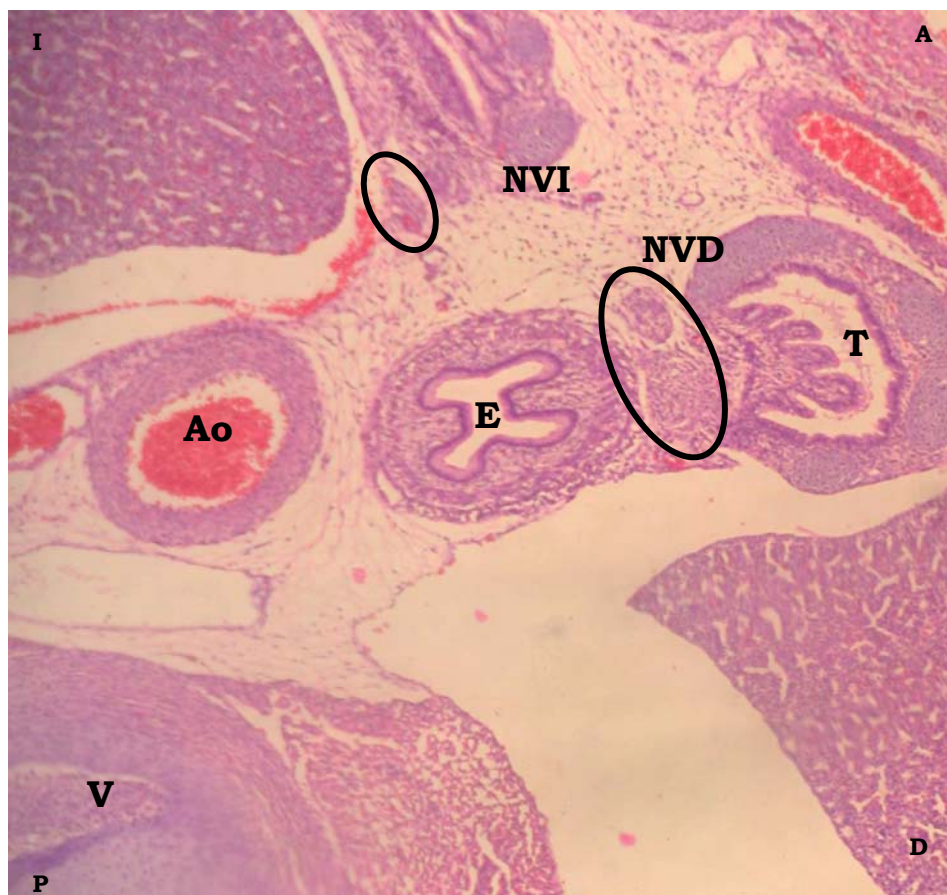


Figura 40: Sección torácica baja para ilustrar el hallazgo de las desviaciones anatómicas en el curso de los troncos vagales. En este animal el NVI camina alejado de su posición normal junto al esófago. NVD: Nervio vago derecho, NVI: Nervio vago izquierdo, Ao: Aorta, E:Esófago, T: Tráquea, V: Vértebra, D: Derecha, I:Izquierda, A:Anterior, P:Posterior. Magnificación original x100.

1.4.- REPRESENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LOS HALLAZGOS ANATÓMICOS EN LA INERVACIÓN ESOFÁGICA EXTRÍNSECA:

Como se expuso en el apartado Material y Métodos, se usó un programa específico de reconstrucción tridimensional llamado TDR-3dbase®. Para su uso, era necesario digitalizar alineándolas cuidadosamente, de 90 a 120 imágenes por feto. Una vez digitalizadas se dibujó el contorno de cada estructura a estudiar en un color diferente constante en todos los animales: estructuras nerviosas (amarillo), esófago (rojo), tráquea (azul) y grandes vasos (rosa).

Se reconstruyeron 4 fetos del grupo Control y otros 4 del grupo HDC. Se consideró un número suficiente dada la ingente cantidad de material y el tiempo consumido en cada uno de los fetos.

En todos los casos se dispuso de una presentación adecuada de los hallazgos, fácilmente comprensible y atractiva para su uso docente. La posibilidad de girar las estructuras estudiadas en las tres dimensiones del espacio, permitió comprender mejor las relaciones anatómicas que existían entre ellas. En las Figuras 41-47 se exponen imágenes aisladas de algunos ejemplos.

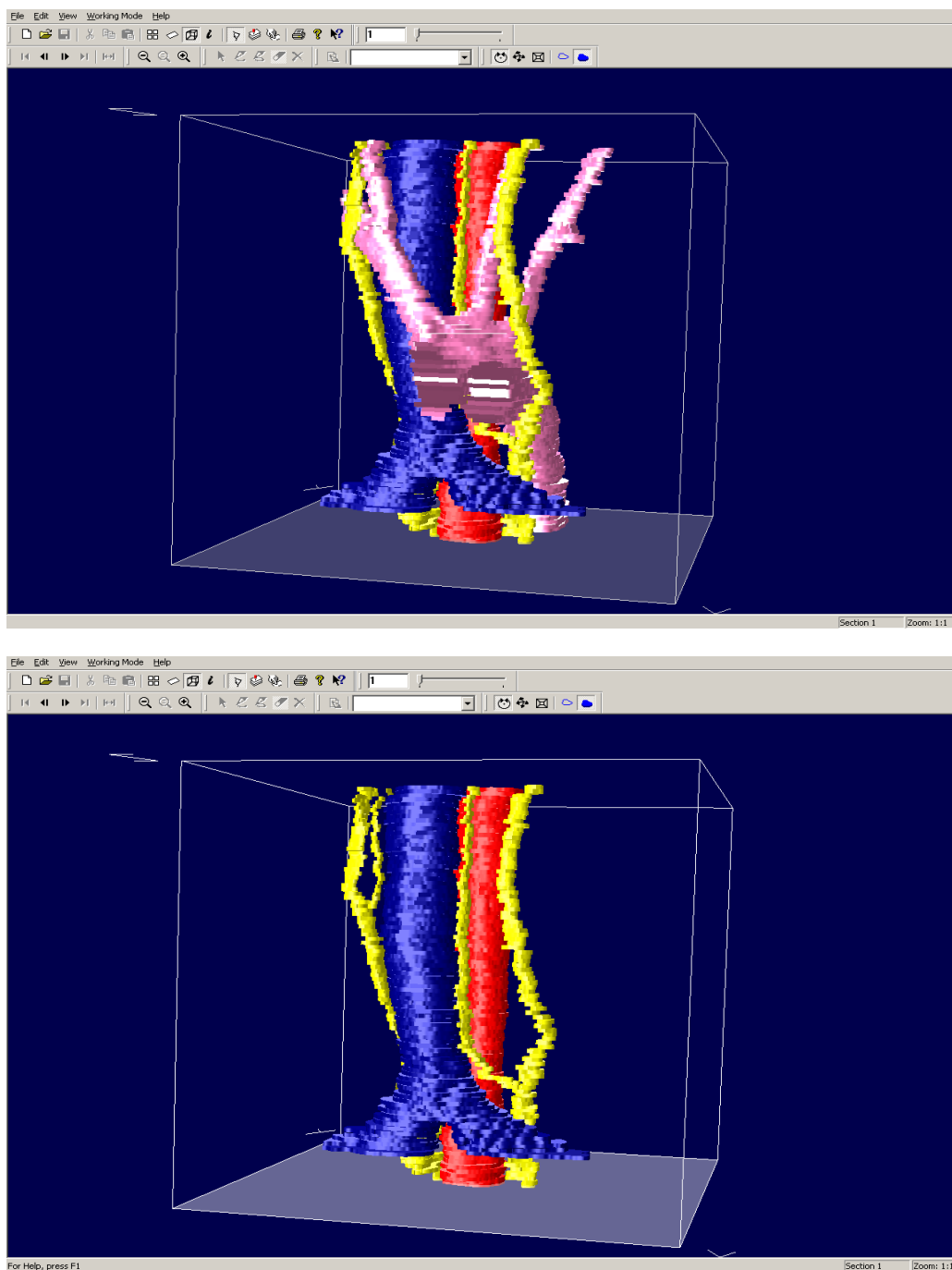


Figura 41: Capturas de pantalla del programa TDR-3dbase® que muestran una reconstrucción en el caso de un feto del grupo Control. Las 2 imágenes muestran las estructuras mediastínicas desde un punto de vista anterior. En la imagen superior se representan los nervios (amarillo), la tráquea (azul), el esófago (rojo) y los grandes vasos (rosa). En la inferior se han eliminado estos últimos.

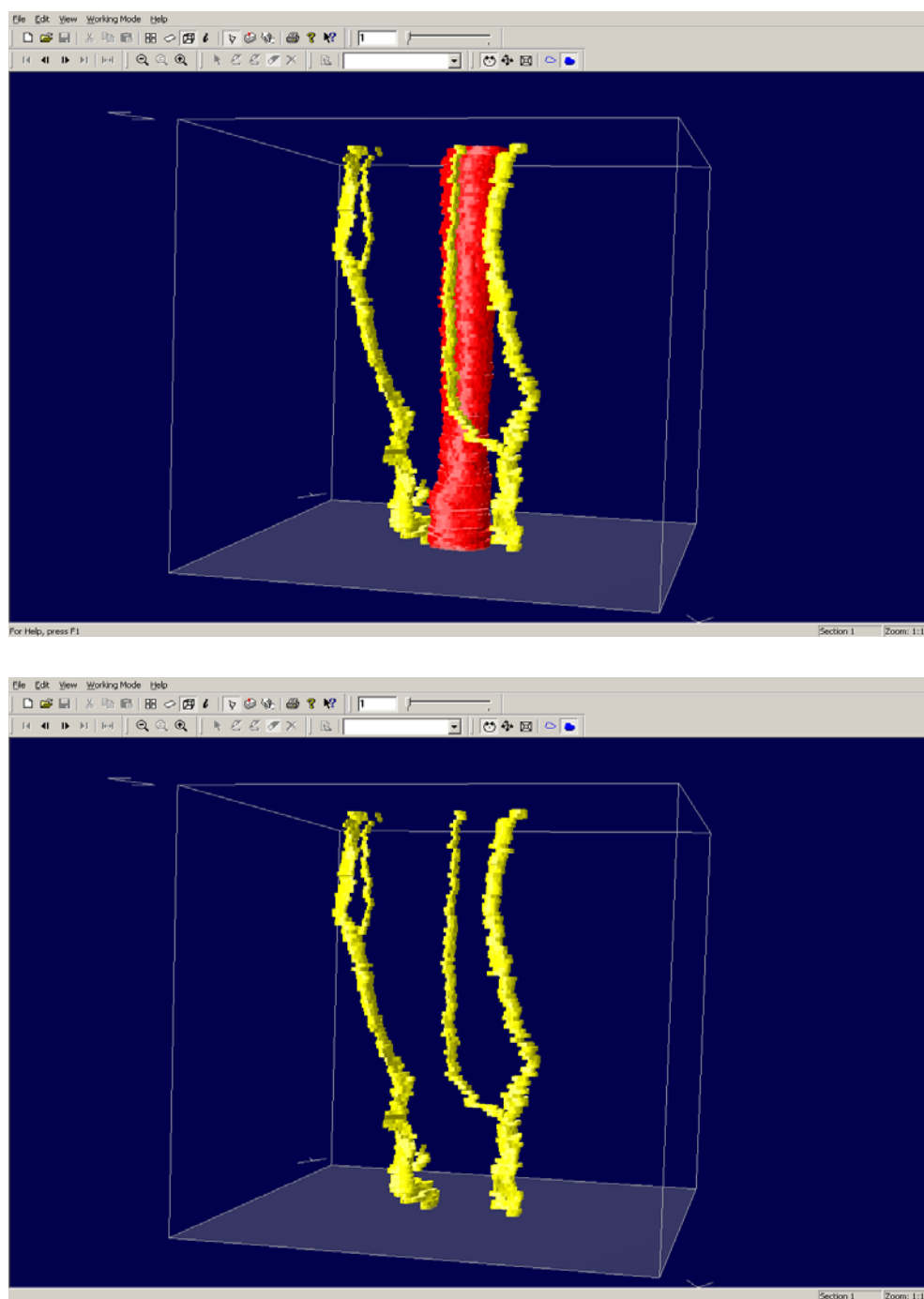


Figura 42: Mismo ejemplo del grupo Control que el correspondiente a la Figura 41. En la imagen superior se ha suprimido ahora la tráquea y los bronquios principales. En la inferior se han dejado tan solo los nervios, siendo claramente visibles ambos vagos y sus recurrentes laríngeos respectivos.

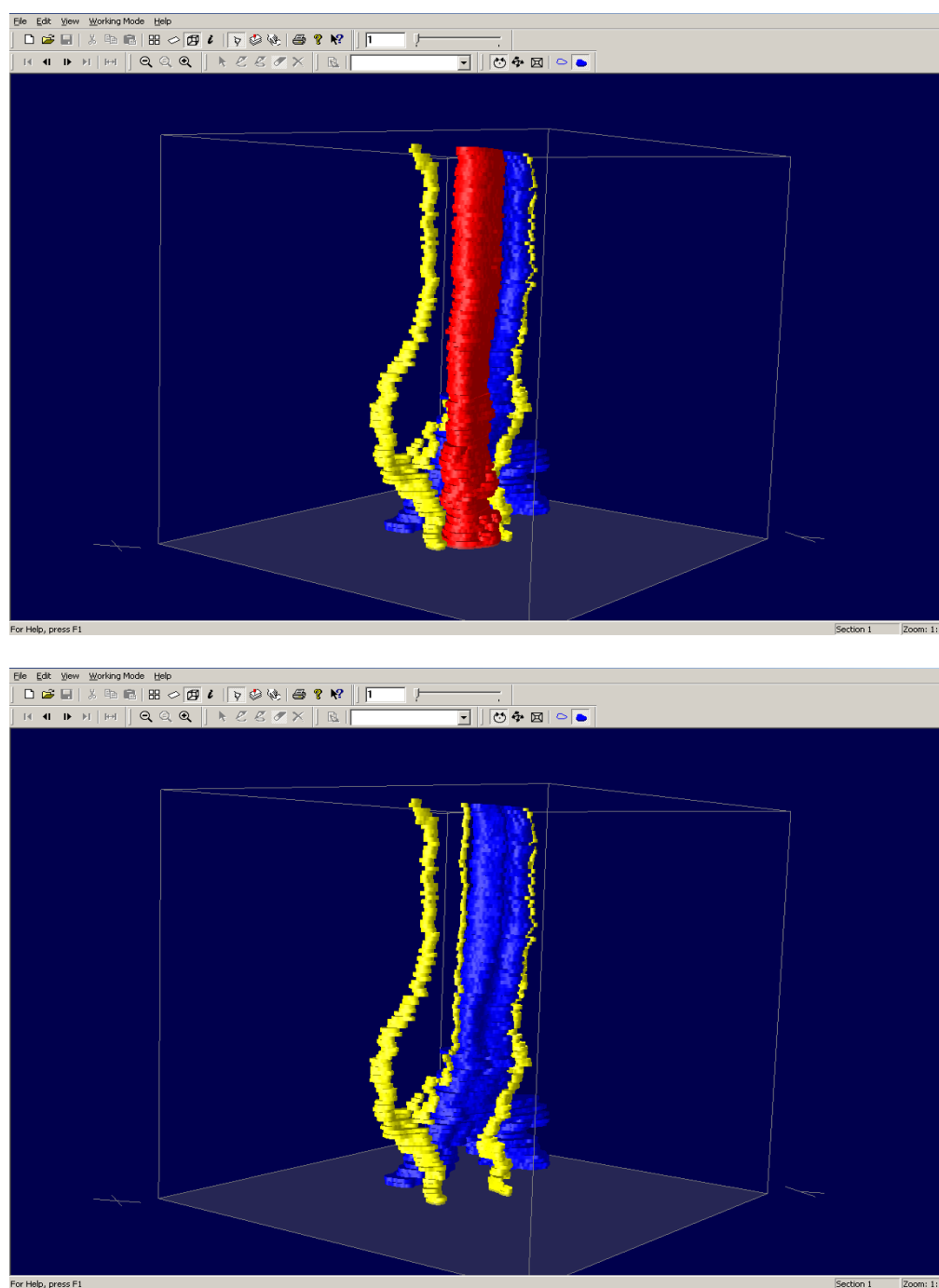


Figura 43: Imagen oblicua izquierda de otro de los fetos del grupo Control. En la parte inferior se ha suprimido el dibujo del esófago para visualizar el recorrido de los nervios y su relación con la tráquea.

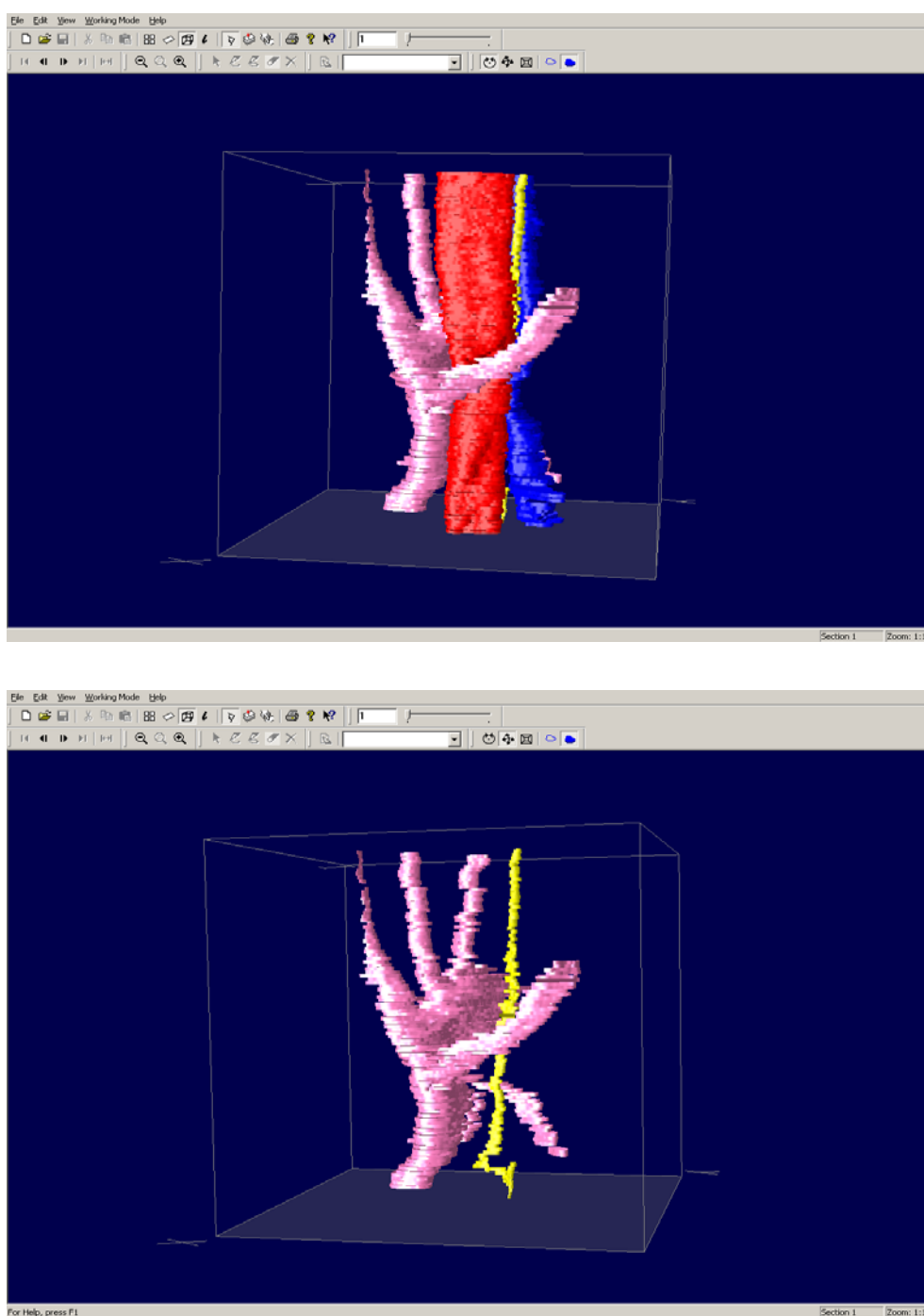


Figura 44: Primer ejemplo correspondiente al grupo HDC. Imágenes postero-anteriores. Este animal presentaba una ASD aberrante retroesofágica fácilmente identificable en la imagen superior. La supresión del esófago y la tráquea (imagen inferior) permite también visualizar la agenesia de NVI y NRLI.

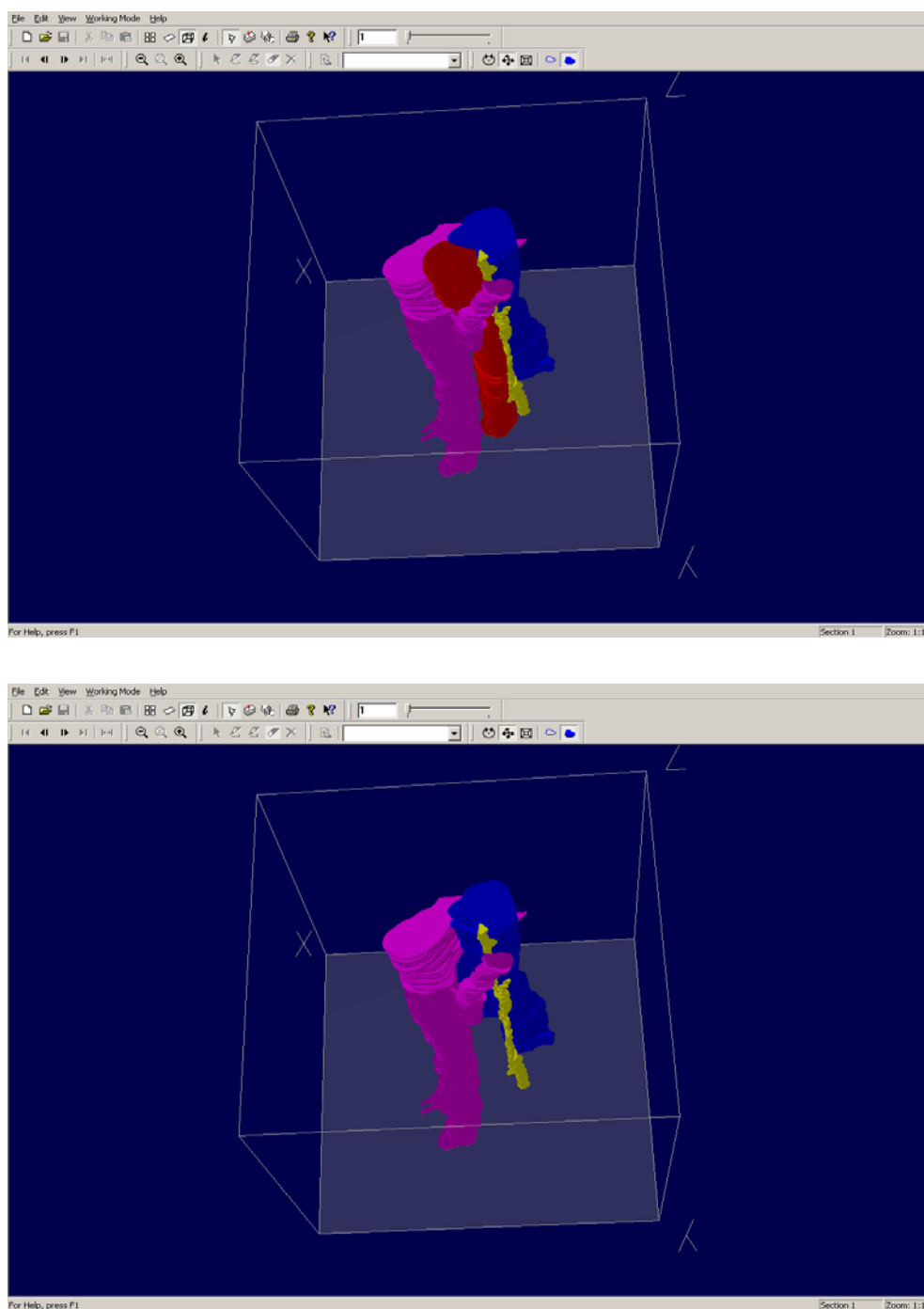


Figura 45: Imagen oblicua postero-superior. Además de una ASD aberrante, existía en este caso una agenesia de NVI y de su correspondiente NRLI.

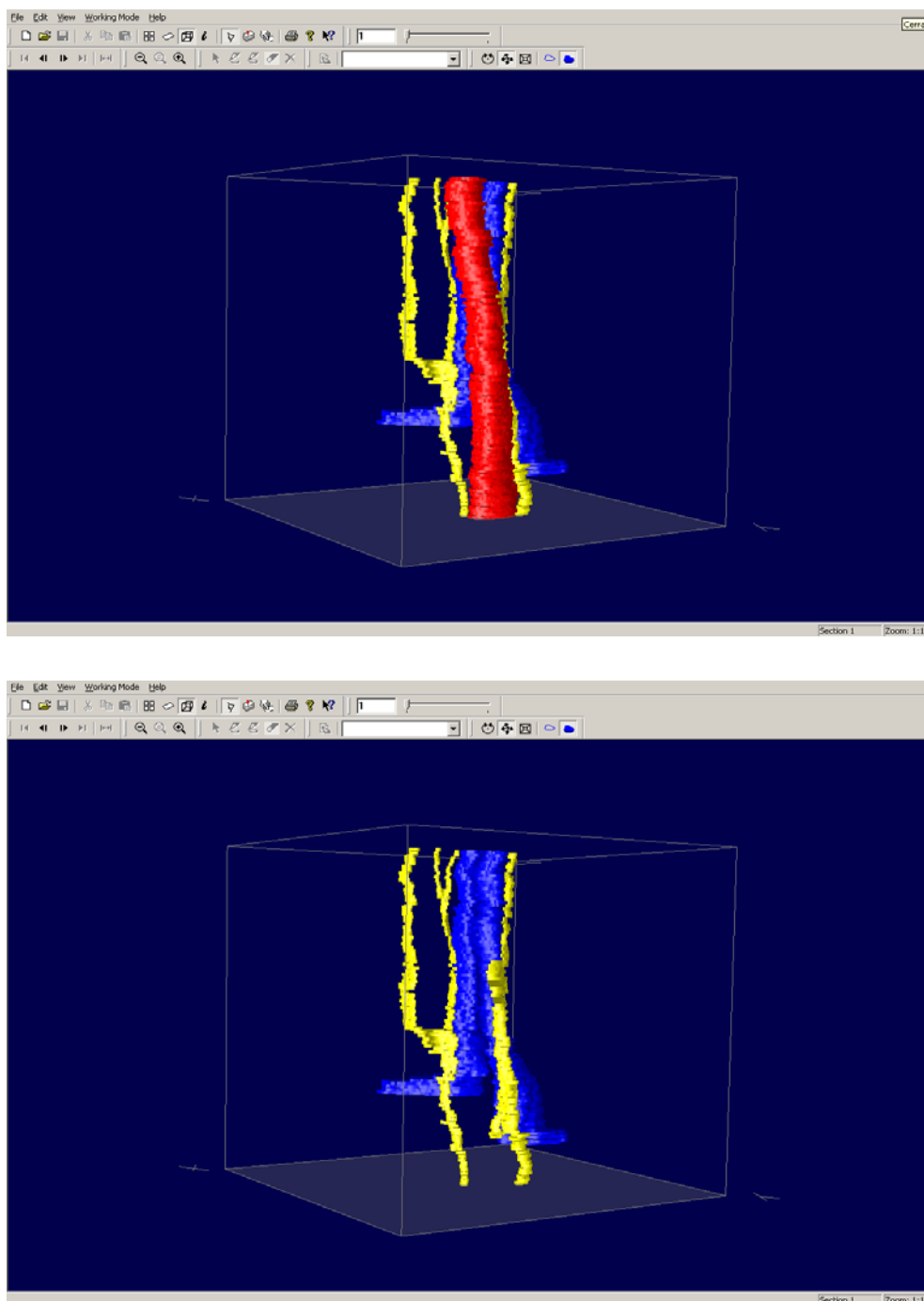


Figura46: Imágenes posteriores de un animal con agenesia de NRLD. Al suprimir el esófago en la imagen inferior, dicha agenesia parece dar la apariencia de un muñón nervioso a nivel de la teórica salida del NRLD.

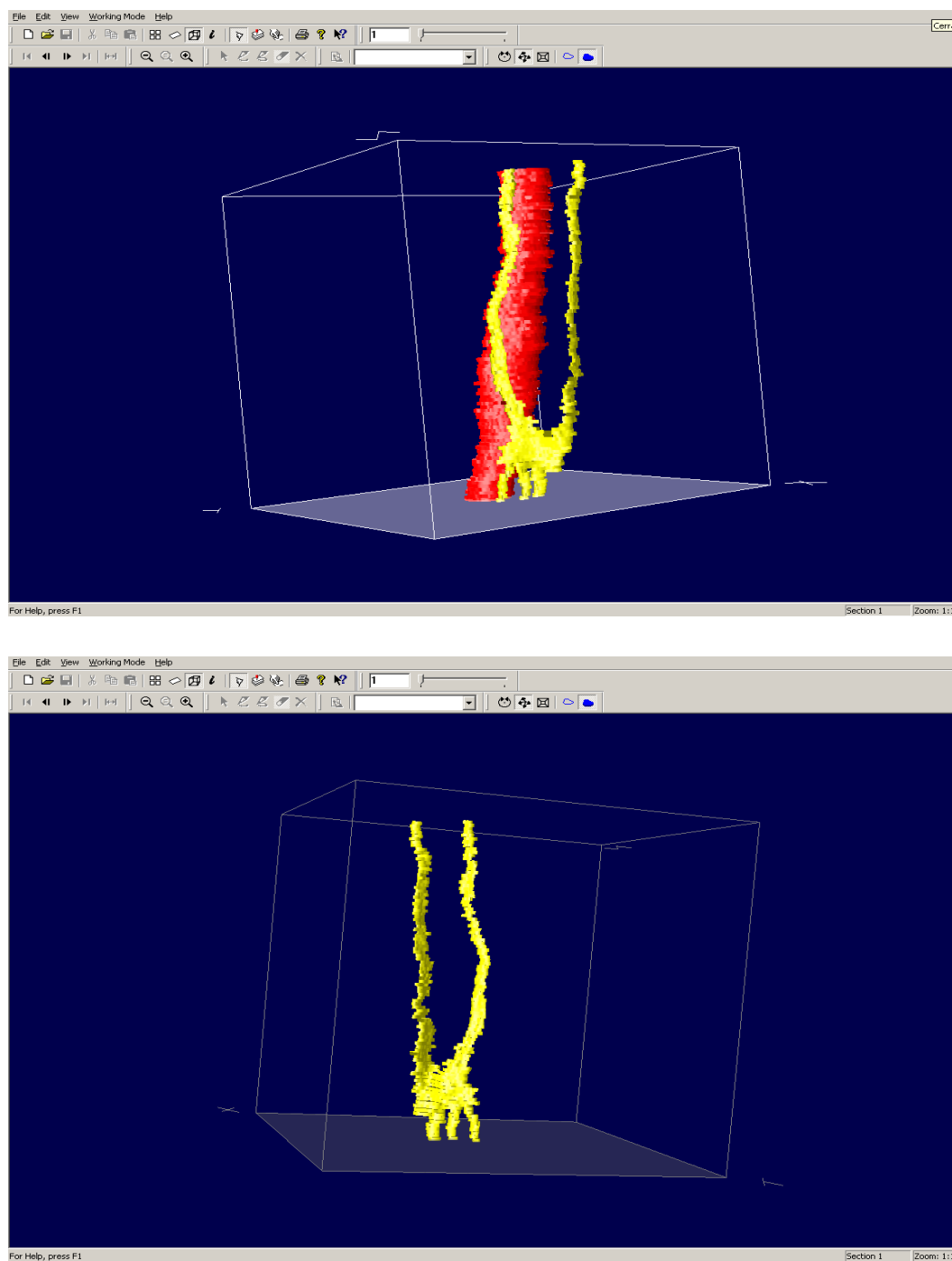


Figura 47: En la parte superior, proyección antero-posterior e izquierda de un animal con agenesia del NVD. Los NVI y NRLI aparecen claramente dibujados. Al suprimir el esófago en la imagen inferior y cambiar la perspectiva a postero-anterior y derecha, apreciamos la anatomía de los troncos nerviosos izquierdos, con las ramificaciones vagales a nivel del cardias.

2.- INERVACION ESOFAGICA INTRINSECA. ESTUDIO INMUNO-HISTOQUÍMICO EN CORTES ESOFAGICOS TRANSVERSALES

2.1.- OBTENCIÓN DE LOS EMBRIONES Y SUJETOS DEL ESTUDIO:

En este estudio se incluyeron 20 fetos del grupo Control y otros 20 del grupo HDC, escogidos de manera aleatoria de las madres gestantes de cada uno de los 2 grupos. Se realizaron cortes transversales del esófago y tinciones inmunohistoquímicas según la metodología descrita en el apartado “Material y métodos”.

2.2.- DESCRIPCIÓN DE LOS HALLAZGOS (Figuras 48-59):

Histológicamente el plexo mientérico de los animales del grupo Control presentaba características normales desde el punto de vista anatomopatológico. Todos los anticuerpos utilizados eran captados por las células nerviosas en localización eutópica acumuladas en ganglios más o menos poblados de células dentro de las capas musculares del esófago. También era claramente visible la inervación extrínseca esofágica en algunos de los cortes.

Por el contrario, el plexo mientérico de los animales del grupo HDC presentaba alteraciones muy evidentes en cuanto al número de ganglios, independientemente del nivel de corte obtenido. Dada la escasez de ganglios en muchas de las muestras, se usó, además de anticuerpos anti-Enolasa y anti S-100, anticuerpo anti-neurofilamento para comprobar los hallazgos.

Cuantitativamente hablando, se estudiaron 14 esófagos del grupo control y otros 14 del grupo HDC. En cada uno se realizaron 6 cortes transversales, 2 a nivel proximal, 2 medio y 2 distales. Se completaron así 84 mediciones del número de ganglios. Los 6 fetos restantes de cada grupo hasta completar el número de 20 citado en la página anterior, se usaron para comprobaciones técnicas y cortes longitudinales.

De manera global, este número fue de $11,085 \pm 3,954$ vs $2,515 \pm 4,105$ (Control vs nitrofen, $p < 0,0001$) (Figura 60). Esta diferencia se mantuvo en los 3 niveles de medición del esófago, proximal, medio y distal (Figuras 61-63). Los datos se muestran como promedio en las mediciones hechas con cada uno de los 3 anticuerpos.

Dentro de cada grupo, la densidad de células o ganglios teñidos en cada nivel de corte, fue similar, sin que existieran diferencias entre los niveles proximal, medio y distal (Figuras 64 y 65).

Por último, no encontramos diferencias en cuanto al número de ganglios dependiendo de la técnica inmunohistoquímica utilizada (datos no mostrados).

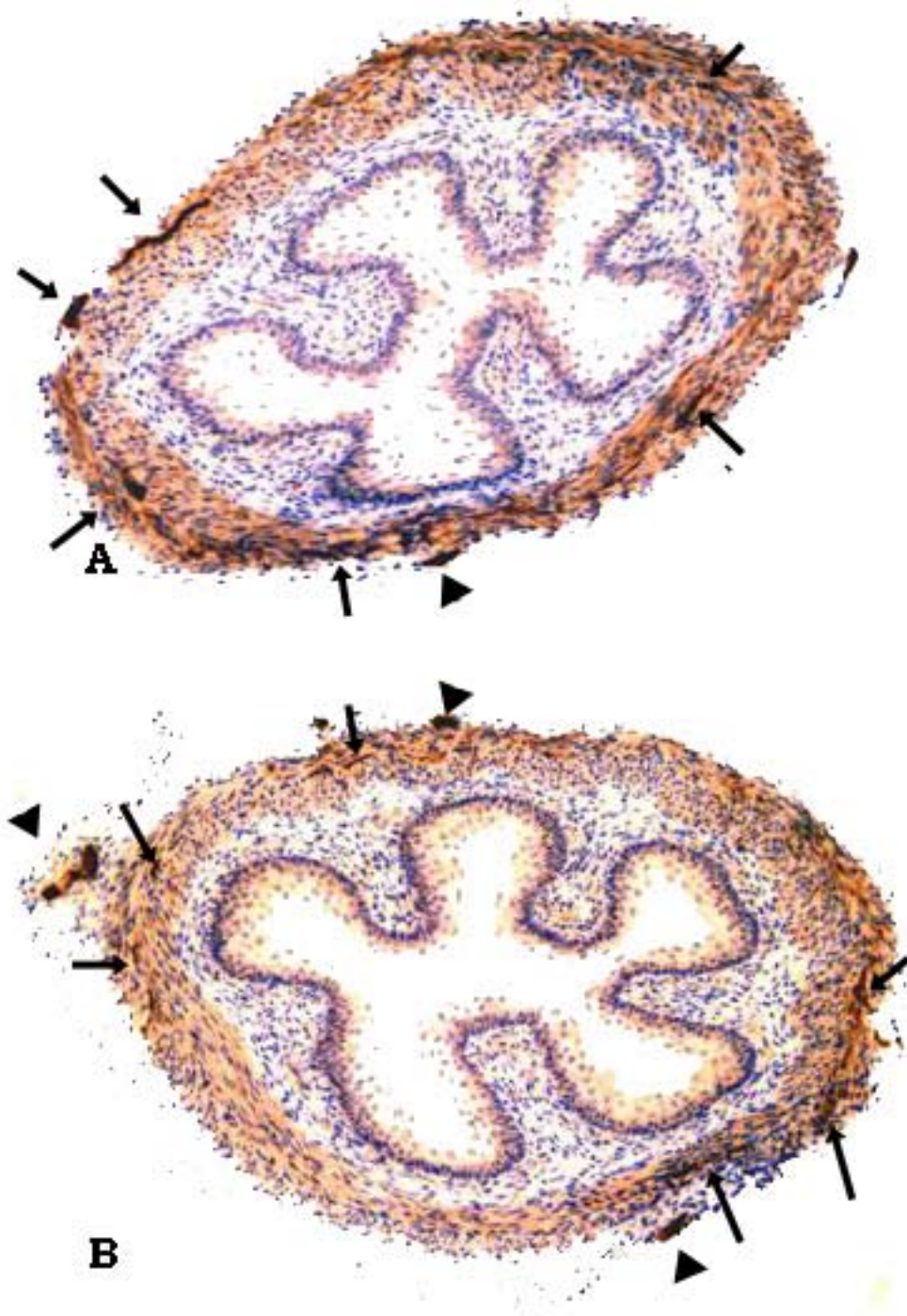


Figura 48: Dos cortes transversales proximal (A) y distal (B) de un esófago de un animal del grupo Control teñidos mediante técnica inmunohistoquímica con anticuerpo anti S-100 y contrateñidos con hematoxilina. Se muestran el tejido nervioso teñido en marrón oscuro, señalados los ganglios del plexo mientérico (flechas) y los nervios extrínsecos dependientes de los vagos (puntas de flecha). Magnificación original x200.

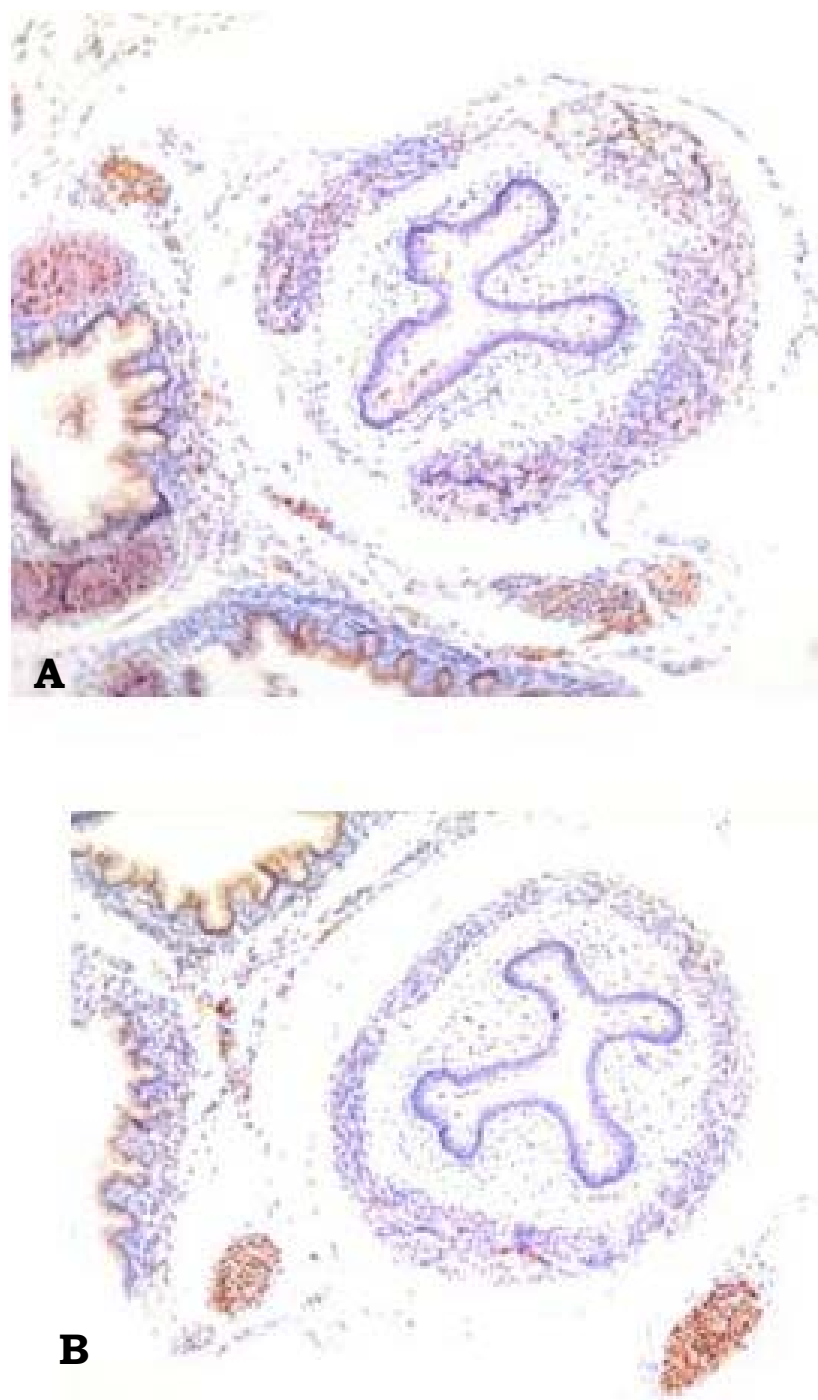


Figura 49: Cortes pertenecientes a esófago medio de un animal del grupo HDC. Técnica inmunohistoquímica anti S-100. Mientras que en la imagen superior (A) el esófago presenta al menos 4 áreas con tinción positiva, en el inferior (B) apenas hay 1. Los nervios vagos y los bronquios sirven en este caso como control positivo de tinción. Magnificación original x200.

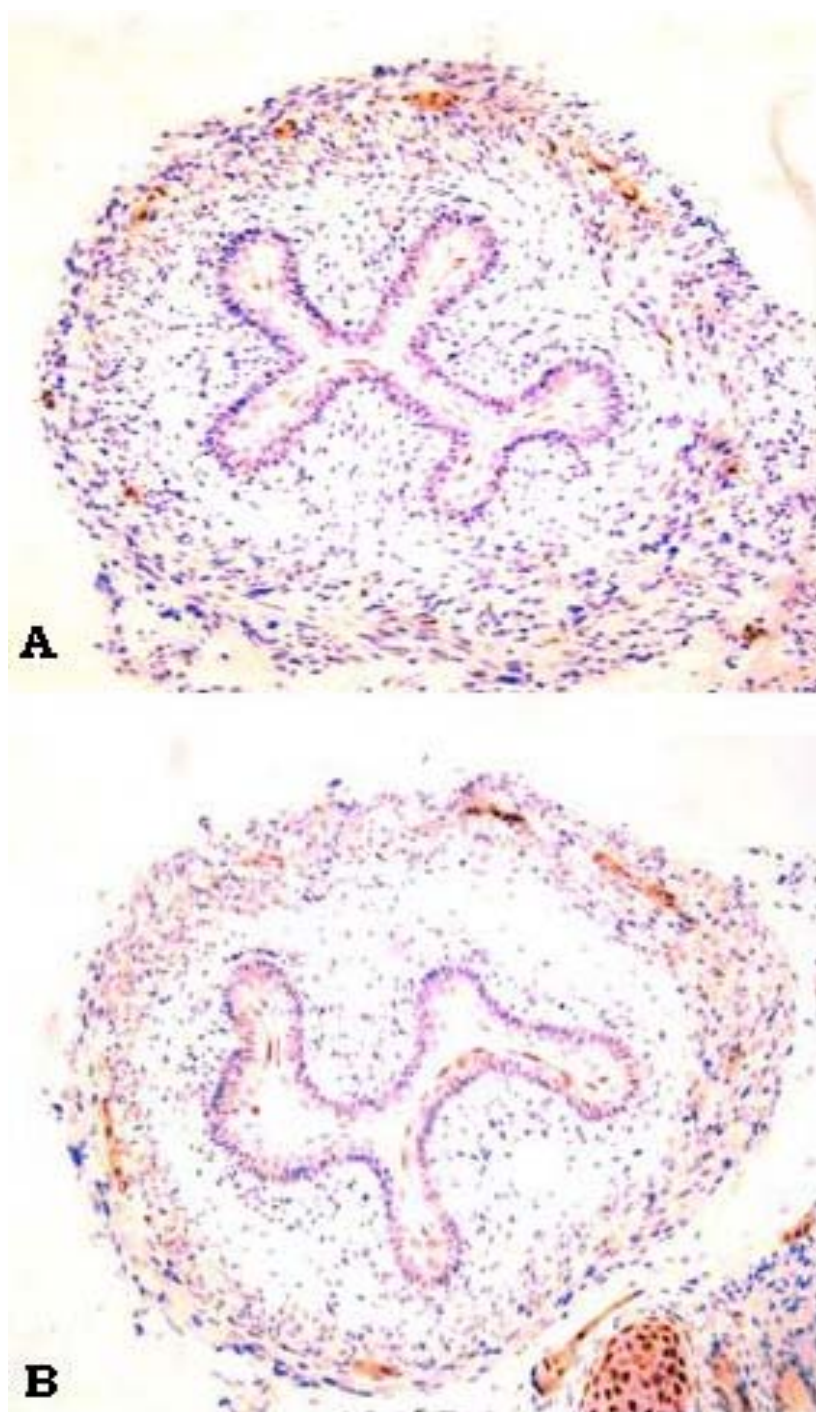


Figura 50: Un nuevo ejemplo de un esófago del grupo Control teñido en esta ocasión con anticuerpo anti Enolasa. Los ganglios del plexo mientérico son claramente visibles, apareciendo un tronco vagal abajo a la derecha en la figura B. Magnificación original x200.

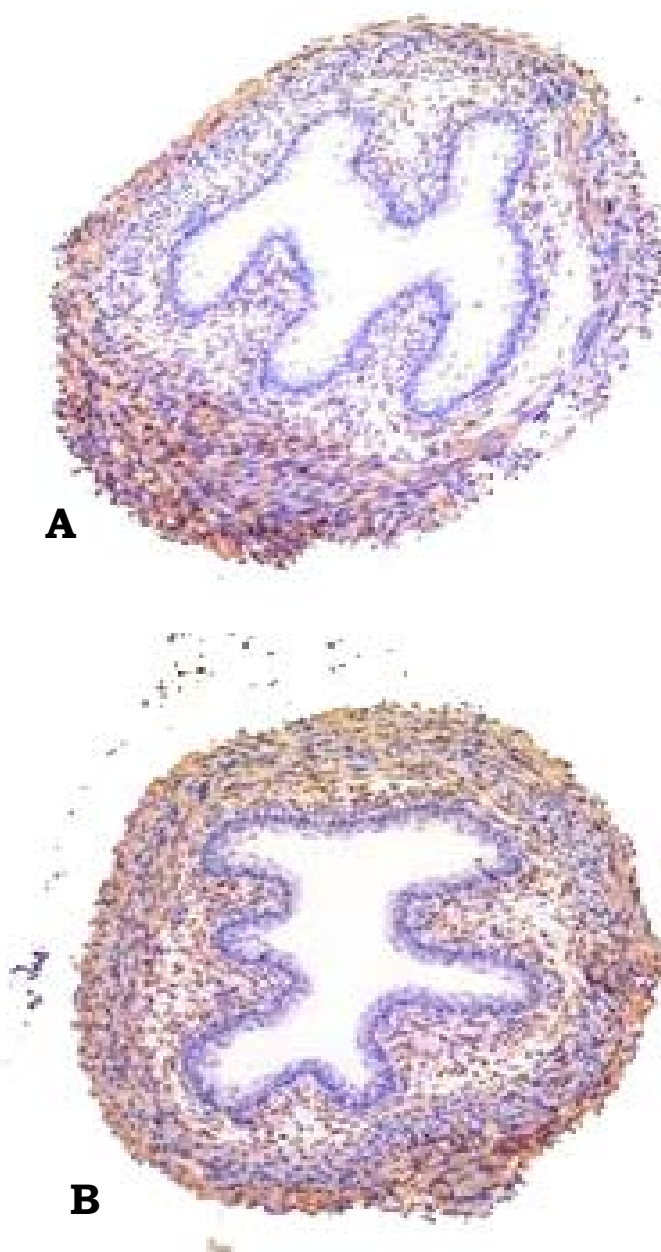


Figura 51: Imágenes de un mismo esófago de un animal del grupo HDC a dos niveles distintos. Técnica inmunohistoquímica anti Enolasa. Tanto en la imagen A como en la B se observa tinción de fondo sin tinción positiva para ganglios o cuerpos neuronales. Magnificación original x200.



Figura 52: Composición de 3 imágenes de un mismo esófago Control y mostradas de proximal a distal de arriba abajo. Técnica inmunohistoquímica anti S-100. De nuevo el plexo mientérico es claramente visible y no hay diferencias en función del nivel del corte. Magnificación original x200

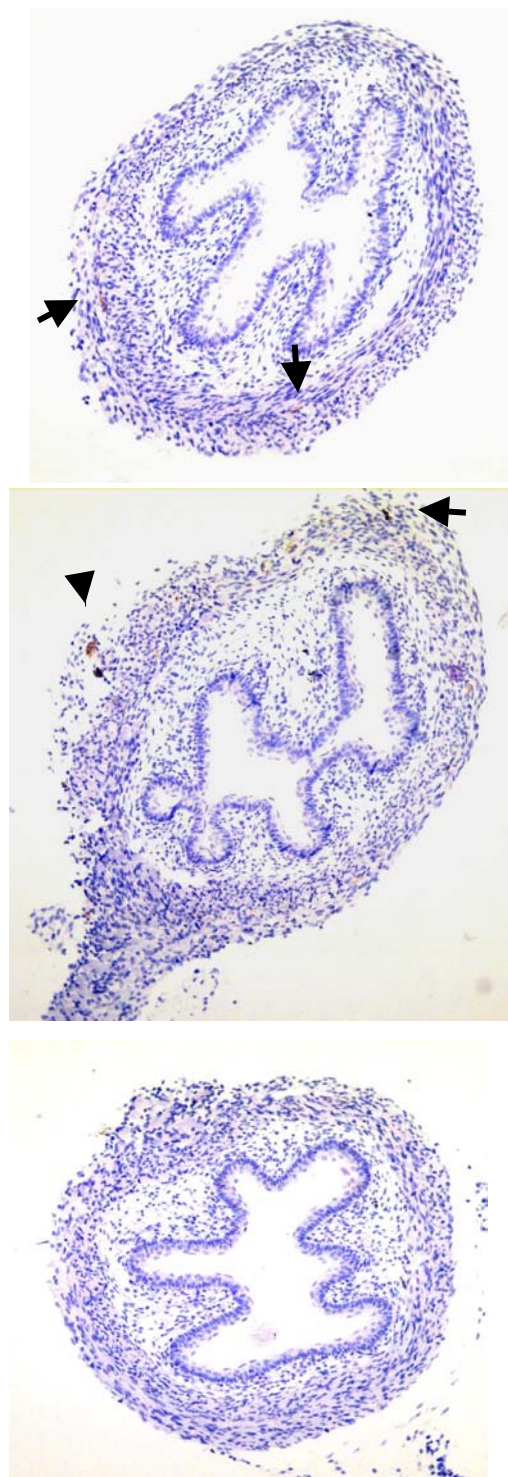


Figura 53: Tres cortes del esófago de un animal del grupo HDC. Técnica inmunohistoquímica anti neurofilamento. En los 2 primeros se aprecian 2 áreas teñidas débilmente positivas (flecha), mientras que en el último (inferior) no hay ninguna. En la figura central un nervio extrínseco (punta de flecha) sirve como control de tinción. Magnificación original x200.

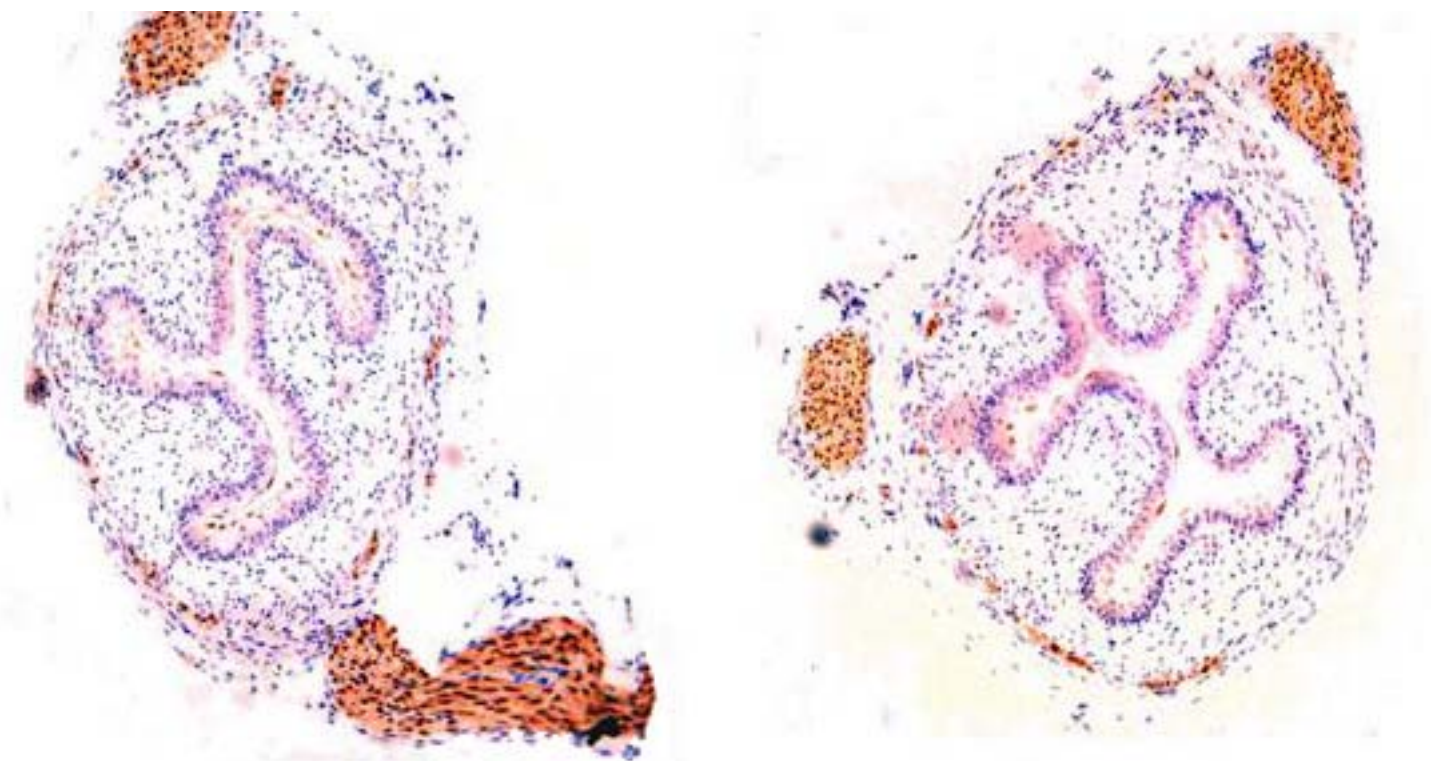


Figura 54: Dos cortes transversales esofágicos distales de un animal Control. Técnica inmunohistoquímica con anti S-100. Se muestran claramente los nervios vagos, uno de ellos (Figura A, abajo a la derecha) con una ramificación. Magnificación original x200.

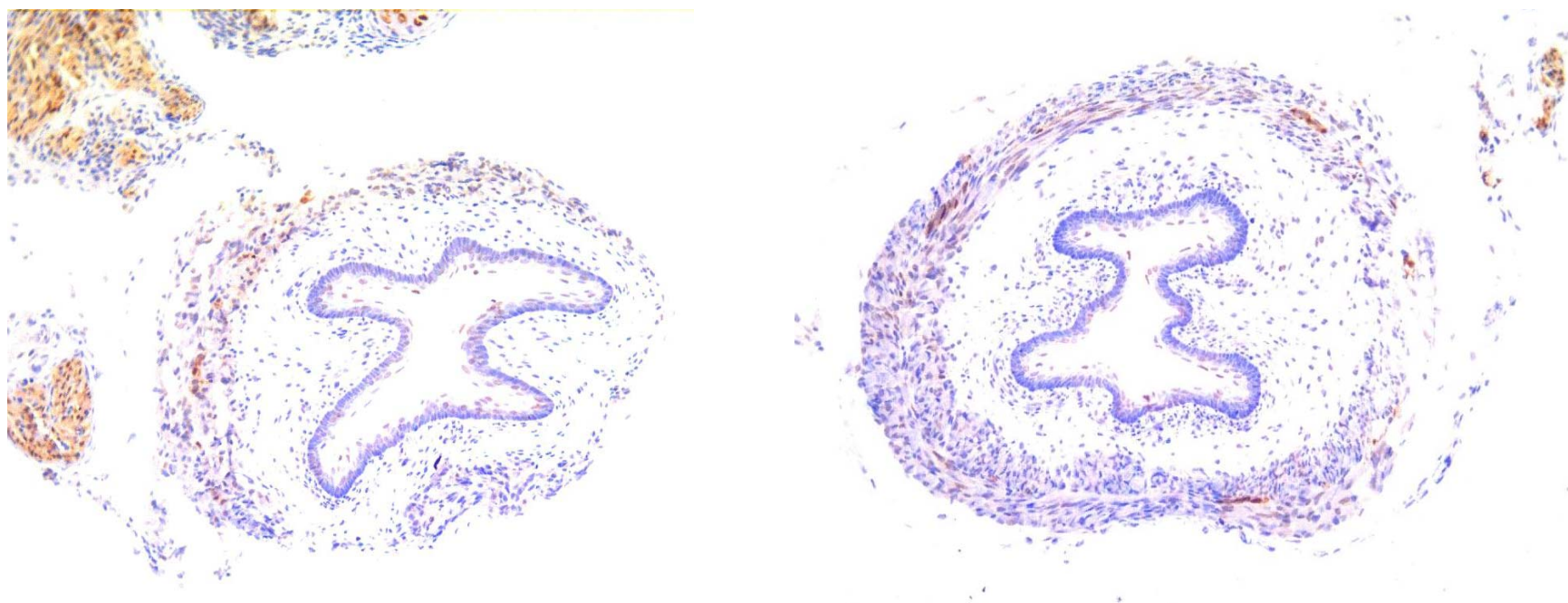


Figura 55: Otros 2 cortes de un animal del grupo HDC. Técnica inmunohistoquímica anti S-100. De nuevo se muestra la escasez de áreas teñidas positivas. Magnificación original x200

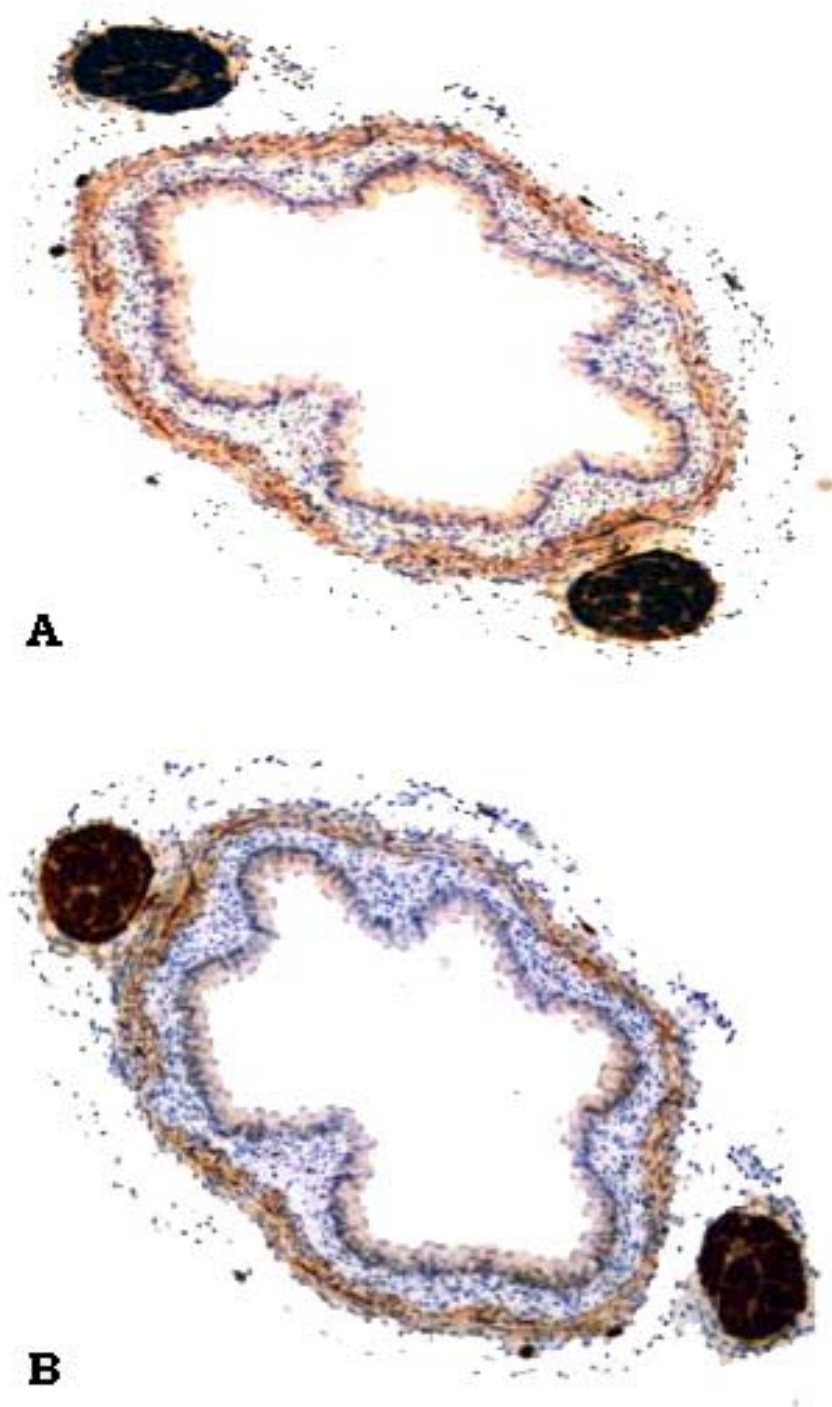


Figura 56: Dos imágenes de un mismo esófago Control teñidas con anticuerpos anti Enolasa (A) y anti S-100 (B). Se muestran para ilustrar la similitud de hallazgos con las 2 técnicas. Magnificación original x200.

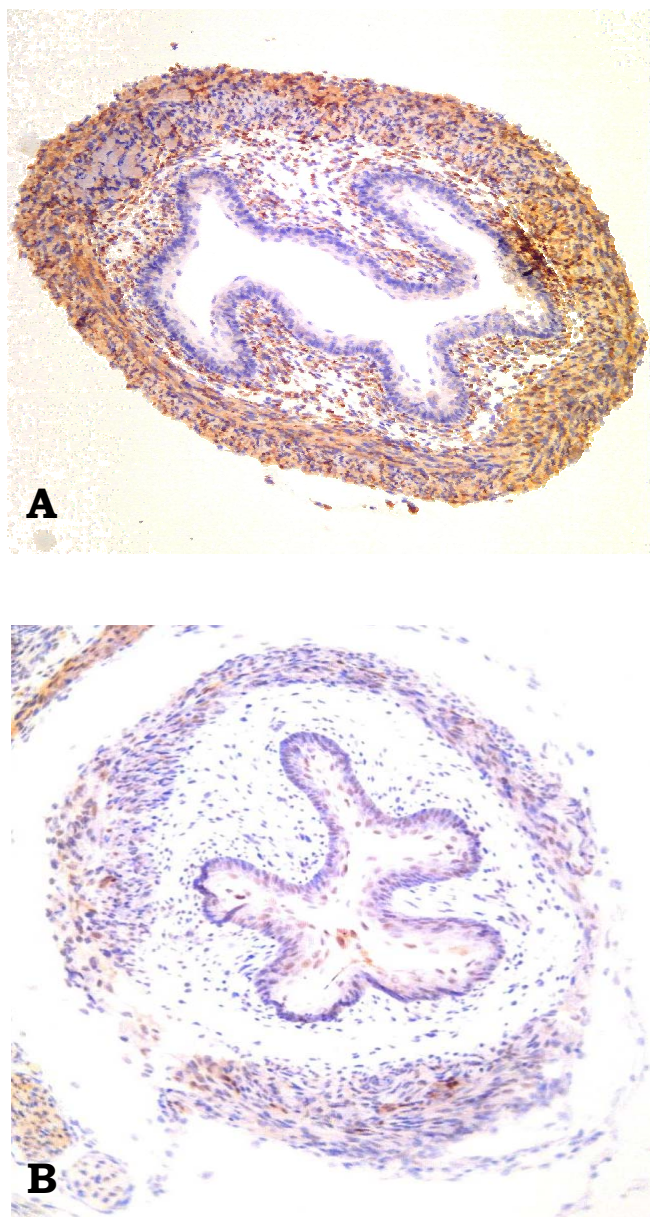


Figura 57: Composición similar a la de la figura anterior ahora en 2 animales del grupo HDC y teñidas con anticuerpos anti Enolasa (A) y anti S-100 (B). Se muestran para ilustrar la similitud de hallazgos con las 2 técnicas. Se puede apreciar la mayor tinción de fondo que se obtiene, habitualmente, con la Enolasa. Magnificación original x200.



Figura 58: Composición de 2 imágenes de sendos animales Control y nitrofen. Inmunohistoquímica anti Enolasa. La diferencia de áreas teñidas positivas es evidente. Magnificación original x200.

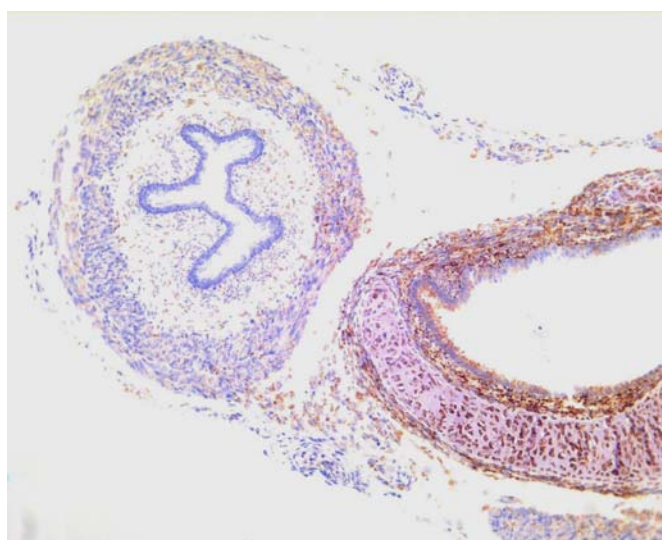


Figura 59: Composición de 2 imágenes de sendos animales Control y Nitrofen. Inmunohistoquímica anti s-100. De nuevo la diferencia de áreas teñidas positivas es evidente. En la imagen del animal del grupo HDC aparece a la derecha la tráquea teñida. Magnificación original x200.

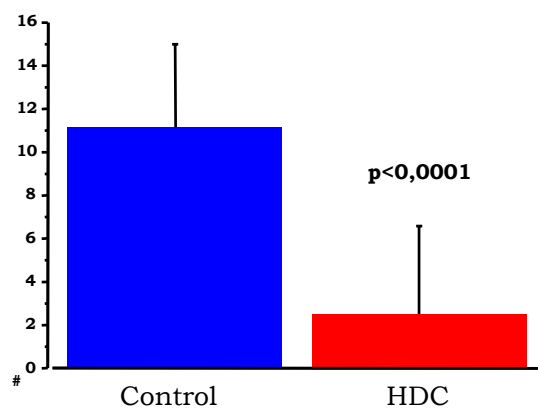


Figura 60: Número **global** de áreas (ganglios o células aisladas) teñidas con enolasa, S-100 o anti-NF en los cortes histológicos del los esófagos de los grupos experimentales.

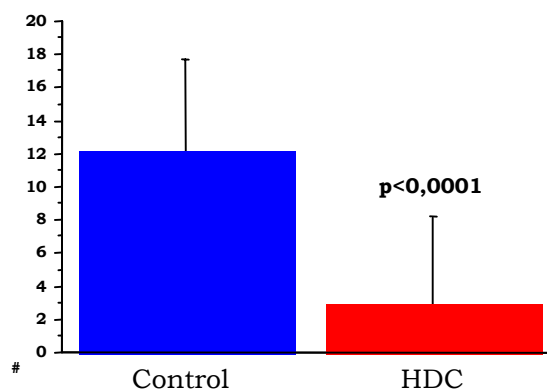


Figura 61: Número de áreas teñidas teñidas con enolasa, S-100 o anti-NF en los cortes histológicos **proximales** del los esófagos de los grupos experimentales.

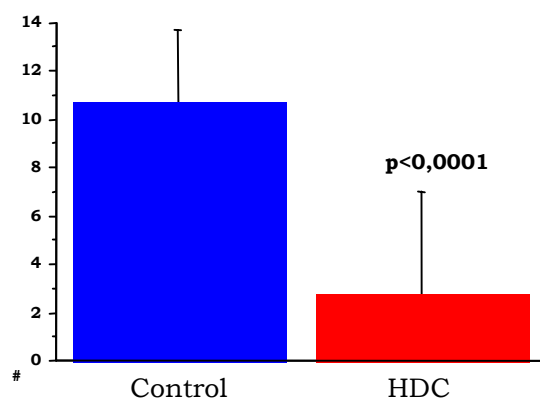


Figura 62: Número de áreas teñidas teñidas con enolasa, S-100 o anti-NF en los cortes histológicos **medios** del los esófagos de los grupos experimentales.

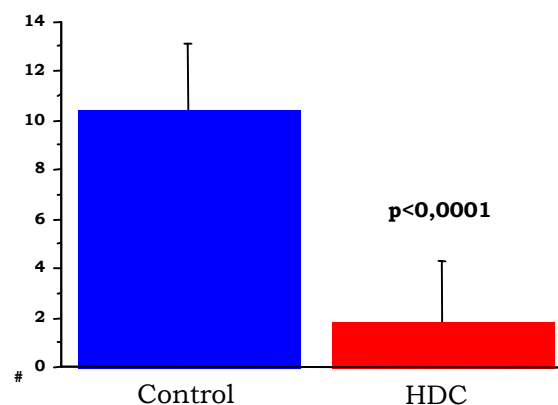


Figura 63: Número de áreas teñidas teñidas con enolasa, S-100 o anti-NF en los cortes histológicos **distales** del los esófagos de los grupos experimentales.

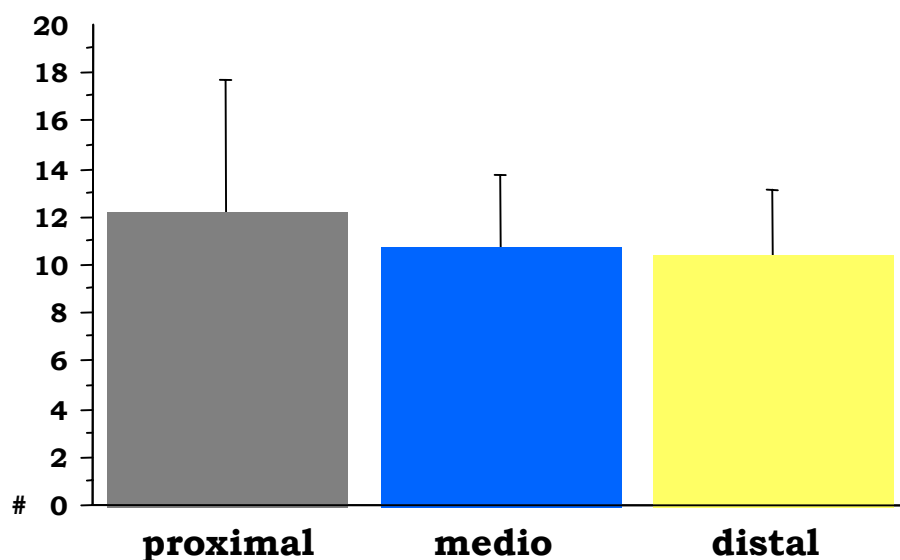


Figura 64: Número de áreas (ganglios o células aisladas) teñidas con enolasa, S-100 o anti-NF en los tres niveles de cortes histológicos en los animales del grupo **Control**.

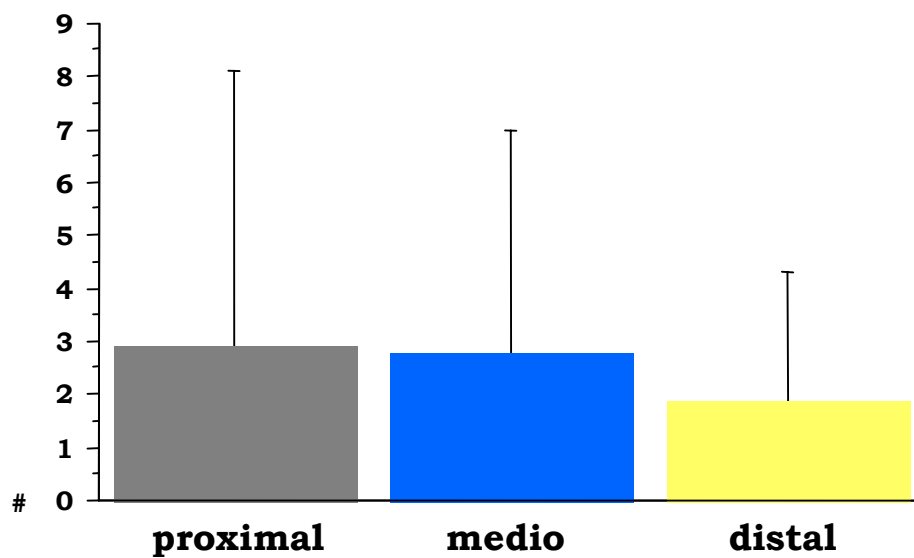


Figura 65: Número de áreas (ganglios o células aisladas) teñidas con enolasa, S-100 o anti-NF positivas en los tres niveles de cortes histológicos en los animales del grupo **HDC**.

3.- INERVACION ESOFAGICA INTRINSECA. ESTUDIO HISTOQUIMICO EN ESÓFAGOS COMPLETOS O “WHOLE MOUNT”.

3.1.- OBTENCIÓN DE LOS EMBRIONES Y SUJETOS DEL ESTUDIO:

En este estudio se incluyeron 10 fetos del grupo Control y otros 10 del grupo HDC, escogidos de manera aleatoria de las madres gestantes de cada uno de los 2 grupos. Se procedió a la técnica de tinción completa del esófago usando para ello, según lo descrito en el apartado Material y Métodos, microscopio de trabajo y material de microcirugía.

3.2.- DESCRIPCIÓN DE LOS HALLAZGOS (Figuras 66 a 71):

De nuevo, tal como ocurría en el estudio inmunohistoquímico, el plexo mientérico de los animales del grupo Control presentaba características consideradas como normales desde el punto de vista anatomopatológico.

Como puede observarse en las Figuras correspondientes al grupo Control, el plexo mientérico esofágico forma una tupida red neuronal cuyos nexos de unión son ganglios repletos de cuerpos celulares. Dichos ganglios se interconectan entre sí por multitud de redes que se encargan, presumiblemente, de transmitir los estímulos nerviosos a lo largo del esófago.

La disección de los esófagos de los animales del grupo HDC resultó más difícil. El tejido se mostró mucho más friable y de manipulación técnicamente más complicada, por lo que el tiempo empleado en su preparación fue siempre mayor. Una vez teñido, el plexo mientérico de

estos animales presentaba alteraciones muy evidentes en la morfología, tal y como aparece en las Figuras 68, 69 y 71. Subjetivamente, la red neuronal tejida era mucho menos compleja y abigarrada, con menor número de conexiones y con menor contenido neuronal. Además los ganglios aparecían más pequeños, peor definidos y con, aparentemente, menor número de células.



Figura 66: Detalle de un esófago del grupo Control teñido mediante técnica de *whole-mount* con Acetil-colinesterasa. Se aprecian claramente los ganglios y la red neuronal que forman en el plexo mientérico del esófago. La línea longitudinal que cruza de arriba abajo por el centro de la imagen corresponde a un vaso sanguíneo del exterior del esófago.
Magnificación original x100

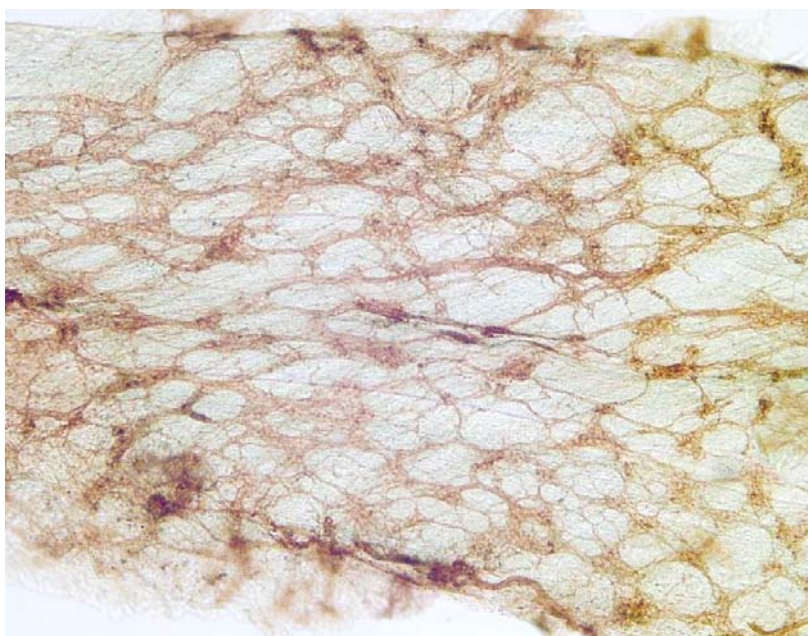


Figura 67: Detalle de otro esófago del grupo Control teñido mediante técnica de *whole-mount* con Acetil-colinesterasa. Magnificación original x100



Figura 68: Detalle de un esófago del grupo HDC teñido mediante técnica de *whole-mount* con Acetil-colinesterasa. Respecto a las figuras de las 2 páginas anteriores se aprecia un menor número de ganglios que, también, parecen ser más pequeños. Magnificación original x100

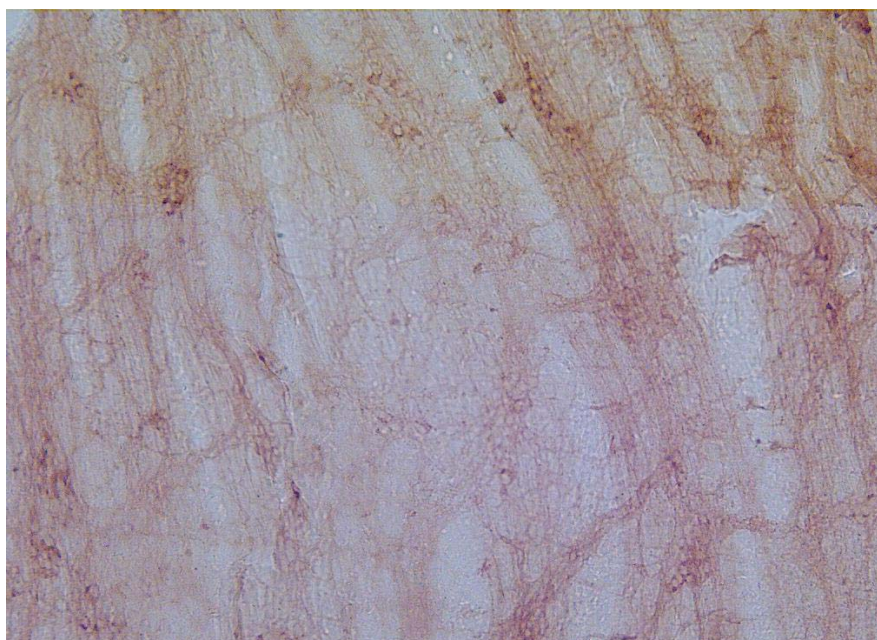


Figura 69: Otro ejemplo de tinción con acetil-colinesterasa en un esófago del grupo HDC. De nuevo se aprecia una menor complejidad de la red neuronal del plexo mientérico y unos ganglios más pequeños y aparentemente en menor número. Magnificación original x100.

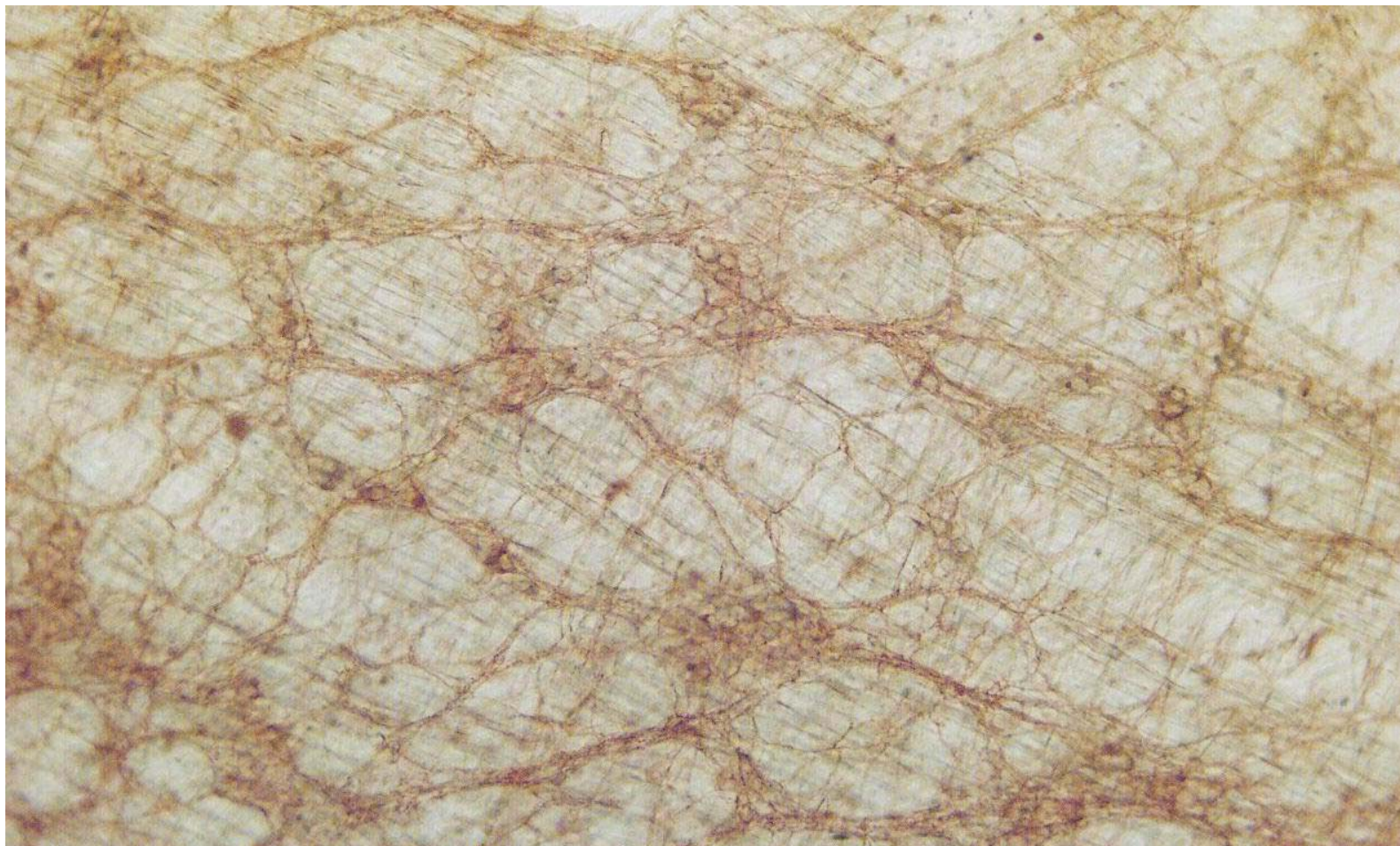


Figura 70: Plexo mientérico de un animal del grupo Control a 200 aumentos. Se pueden apreciar fácilmente los ganglios, las neuronas que los forman y las conexiones que establecen entre ellos.

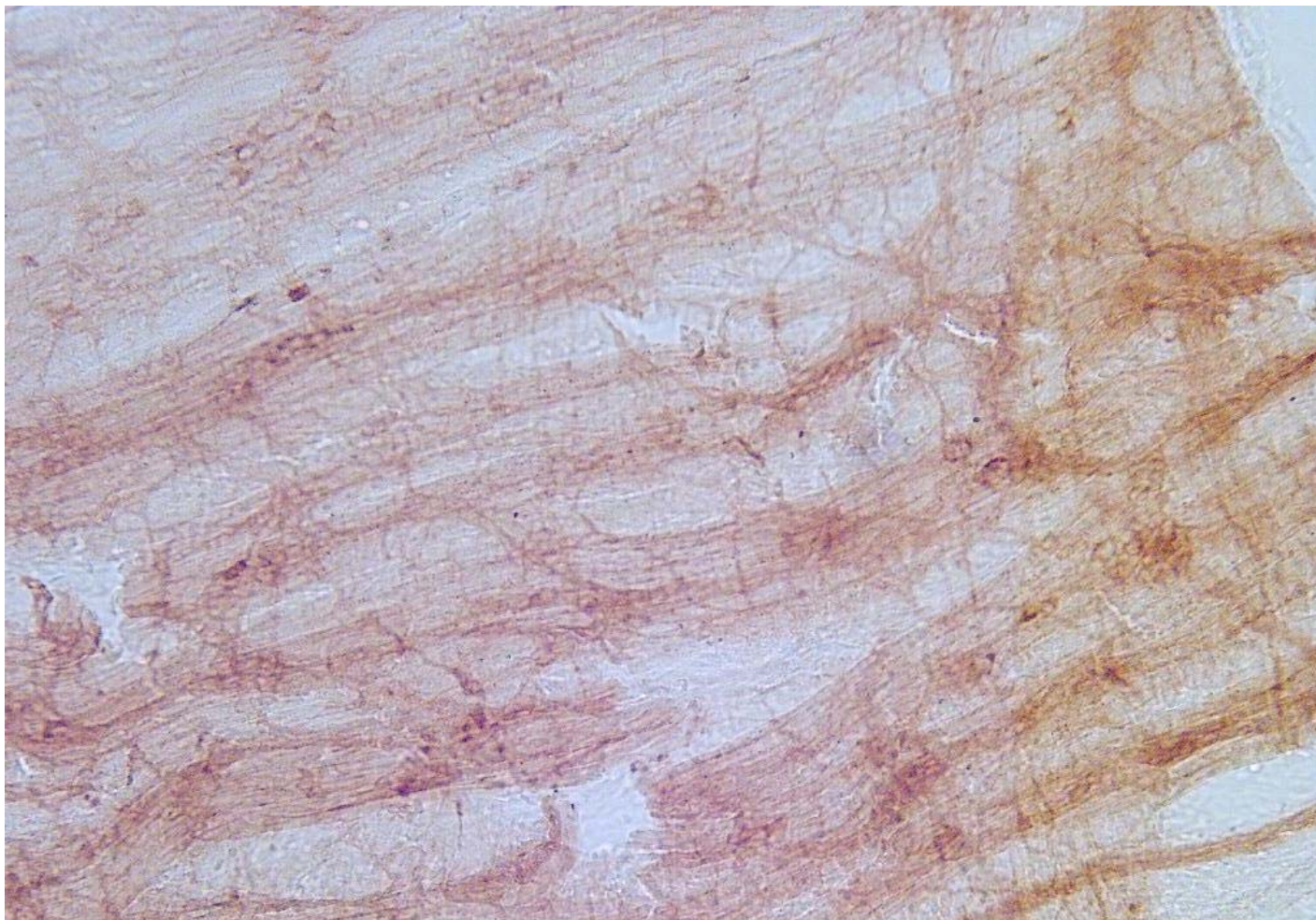


Figura 71: Plexo mientérico de un animal del grupo HDC a 200 aumentos. Comparándola con la anterior, se aprecia una disminución en la complejidad de la red y, aparentemente, un menor tamaño ganglionar y una celularidad disminuida.

3.2.1.- Número de ganglios por campo de gran aumento:

La estimación semicuantitativa de la inervación intrínseca estudiada mediante esta tinción se realizó digitalizando la imagen y usando un programa de análisis según lo expuesto en el apartado Material y Métodos. La primera de las variables analizadas fue el número de ganglios por campo de gran aumento (estandarizado a 200 aumentos para todas las muestras). Se consideraron como “ganglios” a aquellas agrupaciones celulares con 2 ó más neuronas, siempre que éstas aparecieran claramente teñidas.

En los animales del grupo Control el número de ganglios por campo de gran aumento fue de $35,16 \pm 6,57$ mientras que en el grupo HDC fue de $29,29 \pm 10,26$ ($p < 0,05$) (Figura 72).

3.2.2.- Número de células por ganglio:

Cuando la técnica lo hizo posible, se cuantificaron manualmente el número de células teñidas en cada ganglio. En el grupo Control este valor fue de $11,85 \pm 3,52$ mientras que el grupo HDC fue de $2,28 \pm 4,61$ ($p < 0,0001$) (Figura 73).

3.2.3.- Área ganglionar relativa:

Para analizar cuánta área relativa ocupaba el tejido neuronal dentro de cada esófago, se cuantificó en cada campo de gran aumento el área global de los ganglios sumando el área individual de cada uno de ellos. Para evitar sesgos relativos al tamaño del animal, el valor obtenido se dividió entre el área global del esófago en ese mismo campo. Se obtuvo así el valor relativo de la cantidad de tejido nervioso presente en cada segmento esofágico.

En el grupo Control este valor fue de $0,35 \pm 0,32$ mientras que en el grupo HDC fue solamente de $0,18 \pm 0,42$ ($p < 0,0001$) (Figura 74).

3.2.4.- Análisis de los datos en las diferentes regiones esofágicas:

No existieron diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo cuando se analizaron por separado las áreas proximal, media o distal de los esófagos correspondientes (datos no mostrados).

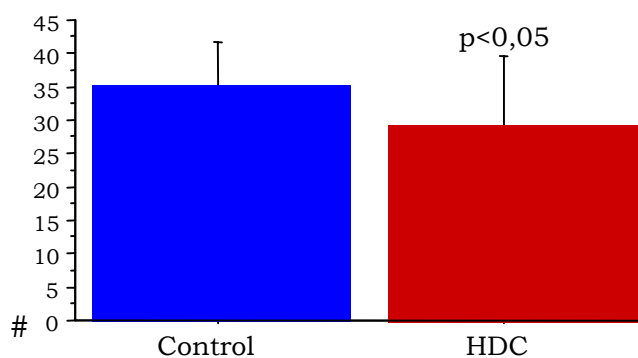


Figura 72: Número de ganglios por campo de gran aumento (x200) en los dos grupos experimentales.

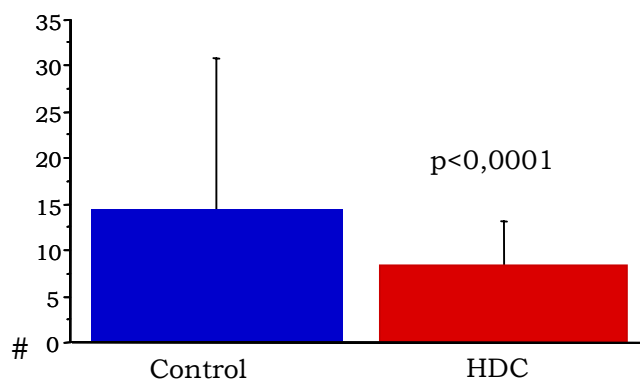


Figura 73: Número de neuronas teñidas en cada ganglio en los 2 grupos experimentales.

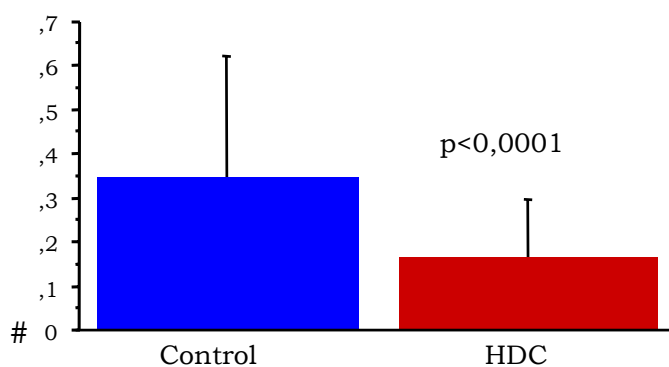


Figura 74: Area ganglionar relativa en cada uno de los 2 grupos.

Discusión

Este trabajo demuestra que los fetos de rata con HDC causada por Nitrofen sufren una afectación severa de la innervación esofágica, tanto extrínseca como intrínseca. Al igual que ocurre con otras muchas malformaciones asociadas en este modelo, el mecanismo que origina esta alteración podría ser una disregulación de la morfogénesis dependiente de la cresta neural. Al mismo tiempo, si se demuestra que los pacientes humanos con HDC también portan esta alteración (como ha ocurrido ya con otras), se habría encontrado una explicación de parte de las manifestaciones digestivas altas de la hernia diafragmática. A continuación analizaremos todos estos datos a la luz de la literatura médica existente.

1.- LA CRESTA NEURAL Y LA ATRESIA DE ESOFAGO

Como hemos explicado en la introducción, la CN es una estructura embrionaria efímera caracterizada por la pluripotencialidad de sus células, que además poseen una capacidad migratoria peculiar. De este tejido derivan tanto huesos como músculos, órganos endocrinos completos y tejido nervioso. Su papel es fundamental en el desarrollo de los organismos craneados y las alteraciones a las que conduce su disregulación son múltiples.

La pequeña historia de por qué nuestro grupo comenzó a investigar sobre la CN comenzó en el año 1999. Curiosamente, la pista no la dio el modelo de HDC sino el de atresia de esófago inducida con Adriamicina. Para comprender mejor la motivación de esta tesis doctoral creo necesario recordar cuáles fueron los orígenes de esta línea de investigación que, involucrando a la CN, emparenta a dos malformaciones congénitas en un mismo origen embrionario.

1.1.- HALLAZGOS MORFOLÓGICOS:

El análisis de las series clínicas de AE y sus malformaciones asociadas, junto a nuestra propia experiencia, muestran sin lugar a dudas que esta enfermedad es un complejo malformativo en el que el número y la naturaleza de diversos defectos conforman un espectro variable, diferente en número y gravedad en cada paciente. Es obvio que algunos de estos defectos tienen una importancia clínica menor, por lo que a veces son infradiagnosticados o no tenidos en cuenta. Sin embargo, cuando son buscados de forma activa nos ofrecen una información patogénica de gran valor. La propia serie de pacientes con AE del Hospital Infantil La Paz recogida de 1965 a 1989 muestra una incidencia de defectos esqueléticos del 50% o de cardiopatías del 30%³²⁹, trabajo que representa el origen de nuestras indagaciones sobre la CN.

Varios de nuestros pacientes presentaban además defectos craneofaciales (asociación CHARGE, fisura palatina o labio leporino, síndrome de Goldenhar o de Treacher-Collins y otras patologías de los arcos branquiales). Los defectos de línea media junto a alguna anomalía respiratoria revelan una disfunción del sistema nervioso autonómico que algunos autores interpretan como sugestivo de neurocristopatía³³⁰⁻³³³, hecho original que nos dirigió a nuestro grupo y a otros a investigar todas estas malformaciones también en el ámbito experimental^{307,329}.

No hay mucha información respecto a malformaciones de las glándulas endocrinas en los pacientes con AE, pero en nuestra serie y otras ³³⁴ encontramos algunos casos de síndrome de DiGeorge (anomalías faciales, defectos cardíacos conotruncales y ausencia de timo y paratiroides). Igualmente el modelo murino de AE muestra cómo los fetos descendientes de madres expuestas a adriamicina durante la gestación tienen una alta proporción de ausencia, hipoplasia o ectopia tímica y paratiroidea²⁷⁵, así como una disminución en el número de células C tiroideas³³⁵. Este último hallazgo experimental debe tener su contrapartida en el humano, tal y

como se deduce de trabajos que encuentran una disminución en el número de estas células en pacientes con síndrome de DiGeorge (algunos con AE asociada) ³³⁶ o defectos conotruncales³³⁷ como los que frecuentemente presentan los enfermos con AE. En ambos casos los autores sugieren la participación de la CN en la etiopatogenia de la malformación.

Más fascinante aún es el hallazgo de cardiopatías congénitas conotruncales en pacientes con AE. En nuestra propia serie 71 de 195 pacientes presentaban anomalías cardíacas mayoritariamente relacionadas con la CN tales como truncus arterioso, estrechez del tracto de salida pulmonar, ventrículo derecho de doble salida, tetralogía de Fallot, trasposición de grandes vasos, etc.³³⁸, defectos que frecuentemente asociaban malformaciones de los grandes vasos. Otras series describen los mismos defectos, evocando de nuevo una participación patogénica de la CN en la AE³³³. De nuevo el modelo experimental coincide con la clínica humana, tanto en la naturaleza como en la proporción de las diversas cardiopatías²⁷⁵.

La innervación esofágica ha sido otro de las estructuras neurocristales investigadas en la AE, inicialmente dirigida a clarificar la hipoperistalsis y la alta incidencia de RGE. En la disección de pacientes no operados con AE Davies encontró que la anatomía del vago y los recurrentes laríngeos, ambos de origen neurocristal, era anormal³¹⁹, como también lo es la innervación traqueal³³⁹. Los mismos hallazgos están, de nuevo, descritos en el modelo experimental, donde tanto la innervación esofágica extrínseca³⁴⁰ como la intrínseca^{341,342} están alteradas.

1.2.- EVIDENCIA GENÉTICA:

Los puntos de unión de la HDC y la AE también están presentes en los mecanismos moleculares responsables de estas malformaciones. Existen evidencias para *Sonic Hedgehog*, para genes Hox y para el ácido retinoico y sus receptores. A continuación analizamos brevemente algunas de estas pruebas, que si se cotejan con las incluidas en la Introducción, arrojan luz sobre la patogenia común de estas dos entidades.

En humanos con AE la expresión de Shh estaba presente en el bolsón proximal pero ausente en la fistula traqueo-esofágica, mientras que los factores Gli se expresaban en ambos²⁷⁷. Al mismo tiempo estudios en explantes de esófagos en ratones tratados con adriamicina muestran que una alteración en la señal de Shh es el mecanismo responsable de la formación de la fistula²⁷⁸. Además los ratones mutantes para Shh y las proteínas Gli tienen malformaciones traqueoesofágicas y varios componentes de la asociación VACTERL³⁰⁶. Además la adriamicina inhibe la expresión de Shh en el intestino anterior²⁷⁹.

Hoxa5 es necesario para el desarrollo pulmonar, por lo que probablemente esté involucrado en la patogenia de la AE. De hecho los dobles mutantes para este gen presentan estenosis traqueal severa y malformaciones de los cartílagos respiratorios²⁹² similares a las encontradas en el modelo experimental de AE^{177,198} y en humanos con la misma patología^{310,311}

En lo que respecta a la vía del ácido retinoico (AR) y sus receptores (RAR), es conocido que los mutantes compuestos para más de un receptor de las familias α , β y γ reproducen el fenotipo resultante de un déficit de vitamina A junto a otras malformaciones. Algunos de ellos presentan, de hecho, una hendidura traqueoesofágica común tapizada por un epitelio ciliar similar al encontrado en los embriones de roedores tratados con

adriamicina, así como alteraciones renales, en los miembros y en el polo caudal que asemejan el fenotipo de la asociación VACTERL^{322,327}.

2.- LA CN Y LA HDC EXPERIMENTAL

El camino abierto por la hipótesis de una alteración de las células de la CN como origen de la AE inducida por Adriamicina, nos llevó a preguntarnos qué pasaba en el caso de la HDC. Disponíamos ya de los dos modelos experimentales completamente protocolizados y, de una manera intuitiva y casi casual, habíamos comprobado que tanto en la rata como en los humanos, las malformaciones acompañantes eran muy similares entre sí.

El Nitrofen, en efecto, produce no sólo el defecto diafragmático sino también cardiopatías congénitas como ventrículo derecho de doble salida, trasposición de grandes vasos o comunicación interventricular^{343,344}. En 1984 Iritani publicó su clásico trabajo sobre la embriología de la HDC, demostrando en él que el herbicida causaba la hernia y también la hipoplasia pulmonar, sugiriendo incluso que esta última contribuía a la formación de la primera y no al contrario²¹. Un poco más tarde el modelo experimental fue perfeccionado^{345,346} y a partir de ahí son numerosísimos los estudios que han permitido estudiar con detalle la enfermedad. Tras unos años iniciales centrados en las alteraciones pulmonares^{73,179,347-349}, pronto se pasó al estudio de las malformaciones que acompañaban al defecto diafragmático y a la hipoplasia pulmonar, tales como renales^{199,350}, las intestinales¹⁸¹, cardíacas^{14,196,273,274}, traqueobronquiales¹⁹⁸, craneofaciales²⁰⁰ o en órganos branquiales derivados de la cresta neural²⁰¹.

2.1.- EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL NITROFEN:

El mecanismo de acción del Nitrofen no es conocido. Inicialmente, y debido a las semejanzas estructurales entre la composición química del Nitrofen y las hormonas tiroideas, se abrió una vía de investigación que involucraba a éstas en la patogenia de la HDC^{351,352}.

De estos primeros estudios también se logró saber que la hipoplasia pulmonar que acompaña al defecto diafragmático, no es tan solo causada por la compresión de las vísceras abdominales, sino también un defecto primario del propio tejido pulmonar. Esta teoría, conocida como de “doble impacto” asume que el herbicida causa su daño no sólo en la organogénesis diafragmática sino también en el desarrollo pulmonar ³⁵³.

Desde entonces han sido muchos los trabajos que han estudiado los mecanismos moleculares implicados en la cascada organogenética responsable del espectro malformativo, en parte también desde nuestro grupo de investigación^{313,352,354-358}, pues la organogénesis pulmonar es un campo mucho más estudiado que la puramente diafragmática³⁵⁹. Los estudios iniciales de los mecanismos moleculares implicados involucraron al factor de transcripción tiroideo TTF-1 y a los genes responsables de la síntesis de las proteínas del surfactante A y B (SP-A y SP-B) ^{192,351,352}.

Hoy parece cada vez más claro que en la etiopatogenia de la malformación interviene, de una manera predominante, la vía del Ácido Retinoico y sus derivados. Se sabe que un déficit gestacional de vitamina A en roedores puede causar HDC³²⁰. En fetos con HDC se ha demostrado un déficit de retinol (metabolito de la vitamina A) y de su proteína transportadora³²¹. Al mismo tiempo, la adición a la dieta de vitamina A disminuye la incidencia de HDC en los fetos de madres gestantes expuestas^{184,185}. Adicionalmente, ratones mutantes para los receptores

del ácido retinoico (RAR^{-/-}) presentan múltiples anomalías incluida HDC³²⁷. Aunque el mecanismo de acción no es conocido, la hipótesis más plausible es que la vitamina A o sus derivados actúen como antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres y de estabilizar los radicales peróxido. De hecho se cree que el Nitrofen actuaría inactivando las deshidrogenasas que intervienen en la formación del ácido retinoico dentro del citoplasma³²⁴.

La hipótesis oxidativa como mecanismo de acción del Nitrofen, está también sustentada por otros hallazgos, como el efecto beneficioso de la vitamina E (otro potente antioxidante) en los fetos expuestos al herbicida⁵³. Nuestro grupo de investigación, además, ha demostrado los mismos efectos con las vitaminas antioxidantes A y C tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*^{54-56,195,360}. Estos trabajos son herederos de los que en los años 80 y 90 del pasado siglo analizaban el efecto de la administración prenatal de corticoides (uso extendido en clínica humana) en las malformaciones experimentales causadas por el Nitrofen en el pulmón^{44,48,190,361,362} o en el corazón⁴⁹.

2.2.- EL NITROFEN Y LA CRESTA NEURAL:

Como hemos venido diciendo, una de las estructuras más verosímilmente implicadas como diana en la acción del Nitrofen es la CN. En efecto, muchas de las malformaciones asociadas al defecto diafragmático en el humano y en el modelo experimental, son en estructuras derivadas de ella. Los ejemplos más evidentes lo constituyen las alteraciones del corazón y los grandes vasos²⁷³, de las estructuras cervicales derivadas de los arcos branquiales^{201,265} y de los huesos del cráneo y la cara²⁰⁰. Síndromes asociados a HDC como el síndrome de Fryns, son catalogados hoy como verdaderas neurocristopatías²⁶².

Además, la migración de las células de la CN depende en gran parte de la acción correcta de la cascada de los retinoides³⁶³⁻³⁶⁵, que como hemos visto en el párrafo anterior, se encuentra alterada en este modelo experimental y en la malformación humana.

Y no se debe perder de vista que tanto en este modelo como en el de AE, algunas de las malformaciones encontradas inicialmente en los roedores han tenido luego su correspondiente confirmación en estudios en tejido humano.

En este contexto se enmarca el estudio de la innervación esofágica de los embriones de rata con HDC. El SNE deriva enteramente de las células de la CN³⁶⁶. Los nervios vagos y sus correspondientes recurrentes laríngeos son también derivados de la CN³⁶⁷⁻³⁶⁹. La función de la innervación vagal en el intestino es superponible y complementaria a la del plexo que forma el SNE, controlando tanto la motilidad del tubo digestivo, como la absorción de nutrientes, el transporte de sustancias a través de su pared o la secreción de hormonas exocrinas³⁷⁰. Si existiera una evidencia clínica de malfunción esofágica en la HDC, estaría más que justificada su indagación en el modelo experimental.

En el apartado siguiente analizamos este hecho, es decir, la presencia de alteraciones funcionales o anatómicas en el esófago de los pacientes humanos con HDC. Como veremos a continuación se trata de un hallazgo frecuente y de gran importancia en la HDC, pero bajo nuestro punto de vista, insuficientemente estudiado.

3.- EL RGE COMO PROBLEMA EN LA HDC:

Al contrario de lo que ocurre en la AE, en la que tanto la incidencia como la fisiopatología del RGE están muy estudiadas, en la HDC existen aún muchas cuestiones por responder. En efecto ya en 1974 existen trabajos que alarman sobre la alta incidencia de reflujo en la AE, así como sobre su asociación a las estenosis anastomóticas recidivantes y la necesidad de su investigación y seguimiento con pH-metría, manometría y estudios radiológicos³⁷¹⁻³⁷³.

Llama la atención por tanto que no sea hasta bien entrada la década de los 90 cuando se empieza a estudiar con profundidad la importancia del RGE en la HDC. La causa no es ajena al mal pronóstico de estos pacientes. No es raro que la mayoría de las publicaciones hasta entonces se centrasen en las complicaciones respiratorias después de la cirugía, y las pocas referencias de seguimientos a medio o largo plazo de alguna serie de pacientes tan solo hablan de función respiratoria^{133,374}.

La primera referencia sobre la alta incidencia de reflujo en la HDC proviene de un estudio de la Universidad de California centrado en la influencia del uso de parche protésico en el pronóstico de estos pacientes y publicado en 1992³⁷⁵. De los 12 casos incluidos, 5 sobrevivieron, de los que 2 requirieron cirugía antirreflujo, incidencia similar a la descrita el mismo año por otros autores³⁷⁶.

Un año más tarde se alarma sobre la alta incidencia de RGE en la HDC. En un estudio de la Universidad de Rotterdam¹⁴⁹, 17 de los 31 pacientes con HDC sobrevivientes presentaron RGE patológico. Esta incidencia es aún mayor en el trabajo de Van Meurs et al¹³⁸, en el que se describe una progresiva disminución de los síntomas de reflujo hasta su total desaparición durante el segundo año de vida. A partir de aquí existen múltiples estudios en series más o menos largas de pacientes

supervivientes que estudian la necesidad de operación antirreflujo¹⁵⁶, asociando o no piloroplastia por una supuesta dismotilidad gástrica ¹⁵⁴ y describiendo diversos factores de riesgo, tales como la posición intratorácica del estómago o el diagnóstico prenatal de la malformación, para sufrir RGE¹⁵³.

Estos y otros trabajos¹⁵⁵ centran su estudio en pacientes graves (generalmente en aquellos que requirieron ECMO) y tan solo durante el primer año de vida. La mayoría de los autores señalan la elevada incidencia de RGE (que alcanza hasta el 89% en los pacientes más graves¹³⁸), la necesidad de alimentación con sonda y el déficit nutricional, que afecta también a una elevada proporción de niños con HDC. En otro trabajo¹³⁷, se advierte sobre la aversión a tragar de estos niños, la imposibilidad de alimentar por boca y, por tanto, la necesidad de gastrostomía hasta en un tercio de los pacientes para poder cubrir las necesidades calóricas. Además el RGE severo condicionó en la experiencia de estos autores a realizar una operación de Nissen en el 21% de los casos.

En 1996 se publican los primeros estudios a largo plazo con datos sobre el seguimiento de grandes series de pacientes con HDC^{145,155}. Resulta particularmente interesante el del grupo de Helsinki, Finlandia¹⁵⁵; en él los autores relatan cómo durante el periodo postoperatorio precoz, tan solo el 18% de los pacientes presentaron síntomas de RGE, porcentaje que en la vida adulta subía al 63%, presentando además el 54% de ellos esofagitis o esófago de Barrett en la endoscopia digestiva.

En suma, el problema del RGE en la HDC está bien reconocido. La mayoría de los autores coinciden en que es universal, que afecta a la mayor parte de los pacientes y que su etiología no está del todo aclarada. Además de factores diafragmáticos como la plicatura, el déficit de motilidad o la necesidad de material protésico para el cierre del

defecto^{137,142,153}, se señalan también como factores predictivos elementos anatómicos embrionarios tales como la posición intratorácica del estómago o una anatomía anormal de la unión esófago gástrica¹⁵³. El problema es de tal magnitud, que en ocasiones se propone la realización de una operación antirreflujo al tiempo de la reparación de la hernia en pacientes con agenesia diafragmática completa¹⁴².

Parece evidente por tanto que en la HDC existen factores asociados que pueden explicar la alta incidencia de RGE. Uno de esos factores podría estar en una anomalía anatómica o funcional del esófago. Como es bien sabido, una alteración en la motilidad esofágica puede explicar una gran parte de los casos de reflujo. De hecho, algunos trabajos publicados hasta la fecha describen alteraciones del esófago en los pacientes con HDC.

4.- LAS ALTERACIONES ESOFAGICAS EN LA HDC:

A finales de la década de los 80 Stolar et al publicaron la primera observación de una alteración esofágica asociada a la HDC¹⁵⁰ en forma de una dilatación esofágica severa en 14 pacientes con HDC, hecho que tan solo había sido descrito de manera anecdótica en una ocasión hasta esa fecha³⁷⁷. En los 12 pacientes que sobrevivieron los autores encontraron RGE, dificultad para la alimentación y escasa ganancia ponderal, respondiendo todos a medidas terapéuticas conservadoras.

Dos años más tarde, los mismos autores publican un artículo más extenso en el que analizan 17 pacientes con el mismo hallazgo¹⁵¹. En esta ocasión demuestran RGE severo en todos ellos, analizado tanto mediante tránsito digestivo superior como con pH-metría, que en el 70% de los casos mostraba dificultad de aclaramiento esofágico. Esta teórica hipoperistalsis esofágica podría explicar la falta de ganancia ponderal y los

síntomas de reflujo persistentes que aquejan estos pacientes. Otro hallazgo llamativo es la presencia de polihidramnios en 13 de los casos, explicado hipotéticamente por una motilidad gástrica disminuida a causa de la herniación visceral intratorácica. Aunque especulan sobre la disfunción del esófago, los autores se centran en los factores anatómicos que podrían explicar estos hallazgos, en concreto el ángulo inusualmente agudo que la unión gastroesofágica presenta cuando el estómago se introduce en el tórax a través del orificio herniario.

A partir de aquí, otros autores comunican hallazgos similares, que alcanzan hasta al 40% de los pacientes con HDC en la serie de la Universidad de Stanford¹³⁸. Sue et al ¹⁵⁸ especulan también con factores anatómicos que podrían explicar el hallazgo de una dilatación esofágica igual a las descritas por Stolar, así como a una excepcional atresia de la unión esófago-gástrica asociada a una HDC. En el año 2001, una publicación de la Universidad de Ankara, Turquía, comunica un caso clínico similar en el que la imposibilidad de la alimentación oral o por sonda obligó a mantener al paciente alimentado mediante yeyunostomía durante 12 meses¹⁵⁷. De nuevo los autores proponen algunos factores anatómicos que justifiquen la dilatación del esófago, en concreto la imposibilidad de deglución del feto debido a una alteración de la unión esofago-gástrica, hecho que además explicaría también el polihidramnios presente en los pacientes con HDC. El mismo año Makhoul et al¹⁶⁰ publican la última referencia al respecto, en este caso una dilatación esofágica en un recién nacido con HDC, hallazgo que, sorprendentemente, desapareció en apenas 15 días.

Todos estos casos clínicos y otros de nuestra serie (Figura 4) demuestran que la dilatación del esófago en los pacientes con HDC no es excepcional. Es probable que, además, este hecho esté infradiagnosticado por la dificultad de interpretar las imágenes radiográficas superpuestas. El culpar a factores anatómicos de este hallazgo no deja de ser sorprendente,

pues cabría esperar que todos los pacientes con HDC la presentaran. Bajo nuestro punto de vista, podrían ser factores funcionales (tales como la hipoperistalsis) los que, influenciados también por la dificultad de paso a través de la unión cardial, expliquen la dilatación del esófago.

Sin embargo existen muy pocos trabajos que analicen la función esofágica en los enfermos con HDC. Jolley et al¹⁶¹ estudian la función esofágica mediante pH-metría en un grupo amplio de pacientes con malrotación intestinal, incluidos 13 con HDC. Los autores tan solo comunican una incidencia muy alta de RGE en estos niños (69%), aunque dado que el estudio no aporta datos epidemiológicos de ellos, las conclusiones que pueden sacarse de él son muy limitadas. Por otro lado, en un reducido número de pacientes austriacos con HDC, se analizan 6 casos de manometría esofágica, siendo todos ellos diagnosticados de RGE severo sin que los autores den más información al respecto¹⁵².

Una aproximación experimental a las causas de la alta incidencia de reflujo en estos pacientes fue proporcionada por nuestro grupo en el año 1997¹⁵⁹. Tras crear una eventración diafragmática cortando el nervio frénico, los investigadores midieron mediante manometría estacionaria las presiones esofágica, abdominal y diafragmática plicando o no el diafragma eventrado. Esta plicatura ocasionaba un aumento del gradiente de presión inspiratorio transdiafragmático al aumentar la presión intratorácica espiratoria y espiratoria. Al mismo tiempo, el RGE se veía además favorecido por una disminución en la presión del esfínter esofágico inferior. Aunque es convincente en sus hallazgos y conclusiones, la principal limitación del estudio es el modelo utilizado, pues no corresponde a una HDC sino a una eventración diafragmática. No obstante, las alteraciones anatómicas diafragmáticas en los pacientes con hernia contribuyen, muy probablemente, a la alta incidencia de RGE observada, tal y como constatan algunos estudios en clínica que observan la motilidad diafragmática en los pacientes con hernia¹⁵².

Las causas de esta dilatación, por tanto, podrían buscarse en alteraciones en la motilidad del esófago. Como es sabido, esta capacidad propulsora reside tanto en la capa muscular digestiva como en el estímulo nervioso que la contrae o la relaja. Las contracciones secuenciales del esófago propulsan así el bolo alimenticio o la saliva, empujando el contenido hacia la cámara gástrica independientemente de la postura corporal. Una malformación en los aferentes vagales esofágicos o en las neuronas que forman el plexo mientérico, podría explicar una disfunción en la capacidad de deglución del niño, una alteración en la motilidad del esófago, una capacidad de aclaramiento del ácido disminuida y una mayor incidencia de RGE. Y esto, en suma, constituye la justificación de esta Tesis Doctoral, en la que pretendemos indagar en la anatomía de la innervación esofágica en el modelo experimental de HDC.

Analizamos de ahora en adelante y a la luz de todo lo expuesto hasta aquí, cómo nuestros hallazgos contribuyen a responder a esta hipótesis.

5.- LAS ALTERACIONES VAGALES EN LA HDC

5.1.- UNA EVIDENCIA MÁS DE LA MALFORMACIÓN NEUROCRISTAL:

Como hemos señalado más arriba, el sistema nervioso autónomo deriva enteramente de la CN³⁰¹. Las células simpáticas y parasimpáticas, así como los ganglios y los nervios vagos derivan de la conocida como CN Vagal³⁶⁸, una porción de esta estructura comprendida entre el núcleo ótico y el somito número 7 del embrión, y que es además el origen de otros derivados ectomesenquimales tales como el tracto de salida cardiaco, el timo y las paratiroides³⁷⁸.

Nuestros datos confirman la hipótesis de una disrupción de la CN como origen de las malformaciones derivadas de la administración de Nitrofen a una rata gestante. La mayoría de los animales estudiados presentaron malformaciones severas y llamativas de los nervios vagos y los recurrentes laríngeos.

Adicionalmente alguno de los fetos mostraba otras anomalías ya descritas en este modelo, tal y como ocurre por ejemplo con la arteria subclavia derecha aberrante, que presentaron 3 animales.

Nuestro trabajo es el primero en objetivar alteraciones en la innervación esofágica en los fetos con HDC inducida con Nitrofen. Además de ofrecer nuevos argumentos a favor de la etiología neurocristal de esta malformación inducida, podría explicar algunos casos de RGE en el humano con HDC si, como ha ocurrido con otros hallazgos, esta malformación esofágica también se termina demostrando en el niño.

5.2.- UTILIDAD DE LA RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL EN EL ESTUDIO:

En investigación biomédica las reconstrucciones tridimensionales se realizan con la finalidad de comprender y analizar fenómenos morfológicos y funcionales complejos. De esta manera no sólo las estructuras anatómicas sino también procesos como la distinta expresión génica en el tiempo y el espacio o la proliferación celular, son mejor comprendidos si se logran visualizar en las 3 dimensiones del espacio³⁷⁹⁻³⁸³.

Los avances en los medios informáticos y de proceso y manipulación de imágenes, hacen posible la reconstrucción de estructuras en 3D a partir de múltiples secciones paralelas bidimensionales. Los ejemplos en clínica son múltiples, pues sus aplicaciones en el diagnóstico de imagen son hoy rutinarias. En investigación su uso crea representaciones en 3D que permiten una comparación detallada de las estructuras y un análisis real de distintos fenómenos funcionales³⁸⁴.

En nuestro caso la representación de la anatomía intratorácica del embrión de rata, supuso una oportunidad para poder visualizar los cambios intratorácicos inducidos con el Nitrofen.

La representación en 3D con ayuda de un software específico ha permitido no sólo una correcta visualización de las estructuras y sus interrelaciones, sino también una adecuada comparación entre grupos y una inmejorable calidad en la comunicación de los resultados desde el punto de vista docente.

5.3.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO DE LA INERVACIÓN ESOFÁGICA EXTRÍNSECA:

La primera limitación de estos hallazgos deriva de la dificultad de trasladar a la entidad humana las anomalías de los roedores con HDC. Aunque de los datos expuestos hasta aquí se deduce que los espectros malformativos en el niño y en los roedores son los mismos, y que el mecanismo etiopatogénico que los causa es superponible, siempre es necesario ser prudente para establecer paralelismos.

La segunda limitación deriva del carácter puramente descriptivo de este estudio. Pueden suponerse anomalías de los nervios vagos en los pacientes con hernia diafragmática, pero tendrán que plantearse estudios en necropsias para poder demostrarlas.

Por otro lado, parece evidente que, para explicar que el RGE está relacionado con las alteraciones vagales, serían necesarios estudios de función esofágica. Aunque hay datos en clínica humana que hablan de malformaciones funcionales del esófago en la HDC¹⁶¹, y algunos estudios experimentales tratan de explicar la fisiopatología del RGE en la HDC¹⁵⁹, no existe evidencia alguna de alteraciones en la motilidad del esófago en el modelo experimental de HDC.

Una elección de este estudio que debe comentarse en este apartado es el hecho que supone descartar a los fetos que no presentan la malformación aunque hayan estado expuestos al Nitrofen. Esto, que puede ser interpretado como una limitación más del trabajo, está justificado. En los primeros trabajos descriptivos tanto de nuestro grupo como de muchos otros, se incluía sistemáticamente un grupo experimental compuesto por estos fetos tratados pero sin hernia^{14,73,385}. De la revisión de la literatura médica y de nuestra experiencia particular, es fácil comprobar cómo estos animales presentan alteraciones que están a medio camino entre los controles y los que sí tienen la HDC. Este hecho, unido al afán comprensible de establecer paralelismos entre el modelo animal y la entidad humana, justifican esta decisión.

6.- LAS ALTERACIONES EN EL PLEXO MIENTERICO EN LA HDC:

6.1.- TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES TRANSVERSALES

6.1.1.- Idoneidad de la técnica:

El uso de la inmunohistoquímica ha permitido en las últimas décadas identificar estructuras anatómicas que, con las tinciones clásicas, no podían ponerse de manifiesto. Antes de su generalización, las técnicas basadas en tinciones argénticas u otras como la de Van Gieson o el azul de metileno eran las más extendidas para la identificación de neuronas y células gliales³⁸⁶. Afortunadamente el desarrollo de anticuerpos frente a multitud de proteínas, más o menos específicas, y su marcaje con un colorante, ha desarrollado de manera espectacular las posibilidades diagnósticas en el campo de la anatomía patológica³⁸⁷. En el caso concreto del tejido nervioso, la especificidad de muchas de las sustancias presentes en las neuronas o su tejido adyacente, hace que el marcaje mediante estas técnicas sea relativamente sencillo.

Existen multitud de anticuerpos susceptibles de usarse en técnicas inmunohistoquímicas para el estudio del sistema nervioso entérico. De todos ellos probablemente el más conocido sea la enolasa neuroespecífica³⁸⁸. En nuestro trabajo obtuvimos imágenes fidedignas del tejido nervioso esofágico mediante su uso.

Otros anticuerpos más específicos que la Enolasa son la Catepsina D, la Cromogranina A, la proteína S-100, el Neurofilamento, el Péptido Intestinal Vasoactivo, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina o la proteína PGP 9,5^{178,387,389}. El uso de uno u otro en el ámbito experimental depende, además de su disponibilidad comercial y precio, de la especificidad con la que reacciona en el animal concreto. De todos ellos nosotros elegimos en primer lugar a la proteína S-100 y, cuando los

hallazgos con ella y con la Enolasa parecían evidentes, aún añadimos uno más (el neurofilamento) para confirmarlos.

6.1.2.- Cuantificación de los hallazgos:

¿Cómo establecer valores uniformes que permitan hacer comparaciones entre los hallazgos de los 2 grupos?. Es evidente que cualquier parámetro mensurable en cortes transversales del esófago choca, en primer lugar, con los problemas intrínsecos de la técnica, por lo que desechamos aquellos cortes con tinciones parciales, difuminadas o artefactadas. Y en segundo lugar con la limitación que impone el estudiar tan solo 6 cortes de cada esófago. En efecto, aunque el tejido nervioso está extendido por toda la pared esofágica, por efecto del azar puede darse que uno o los dos cortes de un área determinada presenten una cantidad de tejido nervioso anormalmente alta o baja con respecto al mismo esófago a otro nivel o a otro animal.

Esta segunda limitación parece más poderosa, por lo que intentamos vencerla en primer lugar estudiando un número elevado de muestras y, en segundo, añadiendo al trabajo la tinción en bloque completo o *whole mount* que comentamos en el apartado siguiente.

Dada la difícil cuantificación del número de células neurales, elegimos como patrón el número de áreas o ganglios teñidos por el anticuerpo en cada corte. Este valor, usado por otros investigadores previamente³⁹⁰ permite la comparación numérica de los hallazgos, pues la tinción ofrece la posibilidad de cuantificar fácilmente la presencia de células aisladas o su acumulación en ganglios nerviosos. En la rata la presencia tan solo de plexo mientérico facilita la tarea del conteo, pues no existen artefactos ni

confusiones posibles con el plexo submucoso que sí encontramos en el ser humano.

El hallazgo en los animales del grupo HDC de un menor número de ganglios o células nerviosas ese nivel no puede considerarse una sorpresa. A la luz de la literatura previa y después de varios años de trabajo de nuestro grupo de investigación, esperábamos que las células del SNE, derivadas de la cresta neural, mostraran alguna alteración tal y como previamente habíamos demostrado, por ejemplo, con las células parafoliculares del tiroides o con los órganos branquiales^{201,391}. Sin embargo, necesitábamos comprobar en una extensión de tejido mayor cómo eran estos cambios, para evitar los posibles sesgos derivados de la técnica de tinción. Por ese motivo añadimos al trabajo el uso de la microdissección quirúrgica del plexo nervioso y su posterior tinción histoquímica con idea de confirmar estos primeros hallazgos.

6.2.- TINCIÓN INMUNOQUÍMICA EN “WHOLE MOUNT”:

6.2.1.- Idoneidad de la técnica:

La técnica de tinción en tejido completo o whole mount se usa de forma rutinaria para el estudio de la innervación de diferentes tejidos desde el inicio de la microscopía. En el caso de la innervación del intestino o de sus estructuras adyacentes, la primera referencia moderna corresponde a un estudio del plexo nervioso de la vesícula biliar en el cerdo³⁹², en el que se pone de manifiesto de manera gráfica la complejidad de la trama ganglionar y nerviosa de esta región anatómica.

Desde entonces y especialmente desde la década de los 80 del siglo pasado, son innumerables los trabajos que estudian la morfología del

plexo mientérico intestinal en el ámbito experimental o en el humano. Por lo que respecta a la patología pediátrica, corresponde sin duda al grupo de Dublín, Irlanda, el haber popularizado el método para el estudio de las malformaciones nerviosas que acompañan a la enfermedad de Hirschsprung o a las displasias neuronales intestinales³⁹³⁻³⁹⁵. Las descripciones de la técnica de tinción en sus trabajos analizadas con el paso del tiempo, ponen de manifiesto un perfeccionamiento constante y unas posibilidades casi ilimitadas de estudio morfológico no sólo en el intestino sino también en otras partes del cuerpo . Sus trabajos han sido pioneros en líneas de investigación que continúan evaluando los trastornos neuronales en las enfermedades colorectales ³⁹⁸.

Más cercano a nuestro trabajo se encuentra el estudio por parte de Qi ¹⁷⁸ en el esófago de ratas con atresia esofágica inducida con Adriamicina. La descripción de la técnica de manipulación del órgano no difiere a la utilizada por nosotros, siendo tan solo distinto el método de tinción posterior.

En suma, la técnica utilizada para la evaluación morfológica del plexo parece adecuada a la luz de la literatura previa. Como ocurría con el estudio en cortes transversales, el problema se planteó en el momento de cuantificar estos hallazgos para lograr comparar numéricamente los 2 grupos experimentales.

6.2.2.- Cuantificación de los hallazgos:

Parece evidente que las descripciones subjetivas de la inervación intestinal no son del todo correctas, pues están sujetas tanto a posibles artefactos de la técnica como a interpretaciones dependientes del observador/investigador. Existen trabajos que emplean tan solo este tipo de parámetros para la descripción de las alteraciones neuronales

intestinales^{178,394}, considerando variables como presencia/ausencia, hipertrofia subjetiva, complejidad de red neuronal,... sin describir ningún valor objetivable y no dependiente del observador.

Sin embargo, son más los autores que usan mediciones más objetivas para la evaluación del plexo mientérico, hecho que no sorprende dada la claridad anatómica de las preparaciones obtenidas. Brevemente, algunas de las mediciones que se han descrito son^{389,390,399,400}:

- Número de ganglios por campo microscópico.
- Número de células por ganglio.
- Número de células por campo microscópico.
- Porcentaje de tejido neural en el plexo.
- Volumen nuclear medio de las células ganglionares.
- Porcentaje de área intestinal ocupada por el plexo medida con una matriz de 165 intersecciones.
- Intensidad de tinción y de colonización de un segmento concreto intestinal, evaluada en una escala determinada y por un observador ajeno al experimento.

Nuestro trabajo usa algunos de estos parámetros para la evaluación del plexo mientérico en el esófago de la rata con HDC, describiendo en primer lugar la impresión subjetiva del observador y usando un método de cuantificación objetiva para el análisis de los datos. En nuestro caso los 3 valores estudiados son reflejo sin duda de la morfología neuronal y de la complejidad del tejido del plexo. Por un lado el número de células por ganglio da una idea del tamaño ganglionar y de la intensidad de colonización o proliferación celular en el tejido. Para evaluar de forma indirecta el tamaño celular, usamos además el área de cada ganglio; en el caso de número de células inferior pero con un tamaño más grande, esta área sería similar en los 2 grupos. El hallazgo sin embargo confirma que la morfología celular es similar en los animales con HDC y en los controles,

pues en los primeros tanto el número de células como en área de cada ganglio es significativamente menor.

Por último, medimos también el área que ocupaban todos los ganglios con respecto al área global del esófago. Esta medición evita el sesgo que pudiera corresponder al menor tamaño y peso de los animales tratados con Nitrofen respecto a los controles. De todos los experimentos de nuestro grupo y de otros sabemos que el peso de los fetos con HDC es significativamente menor al de los controles, lo que obliga a realizar correcciones cuando se trata de evaluar, por ejemplo, hipoplasia pulmonar o cardiaca ^{49,196}.

6.3.- IMPORTANCIA DE LOS HALLAZGOS

Parece evidente la repercusión que tiene una alteración de la innervación del esófago sobre la función digestiva. Como hemos visto en la introducción y está descrito en el Anexo I, los plexos nerviosos se encargan de transmitir las órdenes provenientes del Sistema Nervioso Autónomo. De esta manera se logra la contracción esofágica, un mecanismo que cuando está alterado (como ocurre en la atresia de esófago o en la achalasia) produce sintomatología en ocasiones muy grave. En el caso de la atresia esofágica, además, están descritos múltiples hallazgos patológicos en la innervación esofágica extrínseca e intrínseca tanto en el animal de experimentación como en el humano.

La HDC no es una enfermedad distinta desde este punto de vista. La sintomatología derivada de una malfunción digestiva esofágica o gástrica, ya sea considerada primaria o secundaria, es evidente. Los pacientes que sobreviven a esta condición sufren RGE y dificultades para la alimentación desde la primera infancia. Una de sus principales secuelas a

largo plazo es digestiva, y muchos de ellos necesitan operaciones para el reflujo gastroesofágico. El paralelismo existente entre la enfermedad humana y la obtenida en el animal de experimentación, tal y como hemos descrito en varias partes de este trabajo, añade importancia al hallazgo, pues son esperables anomalías semejantes en el esófago de nuestros pacientes.

Conclusiones

1.- En el modelo experimental de hernia diafragmática congénita inducida con el teratógeno nitrofen, existen importantes alteraciones en la inervación esofágica extrínseca del esófago, que incluyen ausencia de troncos vagales, ausencia de nervios recurrentes laríngeos, hipoplasia nerviosa, desviación del trayecto normal de los nervios, así como cambio de las relaciones anatómicas de éstos con el resto de estructuras mediastínicas.

2.- El plexo mientérico esofágico de los animales con hernia diafragmática congénita presentó también importantes diferencias con respecto al de los controles. Dichas alteraciones no han sido descritas hasta la fecha y reflejan, junto con las correspondientes a los nervios vago y recurrente laríngeo, un desarrollo anormal de estas estructuras derivadas de la cresta neural.

3.- Los estudios morfométricos del plexo mientérico realizados mediante técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas, demuestran un menor desarrollo en los fetos con hernia diafragmática en comparación con los controles en términos de número de áreas ganglionares, número de ganglios, número de células teñidas y área ganglionar relativa.

4.- Estos hallazgos representan una evidencia experimental más de la participación de la cresta neural en la etiopatogenia de esta enfermedad.

Bibliografía

1. Puri P, Wester T. 1997. Historical aspects of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 12:95-100.
2. Wenstrom KD, Weiner CP, Hanson JW. 1991. A five-year statewide experience with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 165:838-842.
3. Lally KP. 2002. Congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr* 14:486-490.
4. Tibboel D, Gaag AV. 1996. Etiologic and genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 23:689-699.
5. Enns GM, Cox VA, Goldstein RB, Gibbs DL, Harrison MR, Golabi M. 1998. Congenital diaphragmatic defects and associated syndromes, malformations, and chromosome anomalies: a retrospective study of 60 patients and literature review. *Am J Med Genet* 79:215-225.
6. Slavotinek AM. 2005. The genetics of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol* 29:77-85.
7. Slavotinek AM. 2004. Fryns syndrome: a review of the phenotype and diagnostic guidelines. *Am J Med Genet A* 124:427-433.
8. Slavotinek A, Lee SS, Davis R, Shrit A, Leppig KA, Rhim J, Jasnosz K, Albertson D, Pinkel D. 2005. Fryns syndrome phenotype caused by chromosome microdeletions at 15q26.2 and 8p23.1. *J Med Genet* 42:730-736.
9. Fauza DO, Wilson JM. 1994. Congenital diaphragmatic hernia and associated anomalies: their incidence, identification, and impact on prognosis. *J Pediatr Surg* 29:1113-1117.
10. Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. 2000. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 35:1187-1197.
11. Martinez-Frias ML, Prieto L, Urioste M, Bermejo E. 1996. Clinical/epidemiological analysis of congenital anomalies associated with diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 62:71-76.
12. Sweed Y, Puri P. 1993. Congenital diaphragmatic hernia: influence of associated malformations on survival. *Arch Dis Child* 69:68-70.
13. Allan LD, Irish MS, Glick PL. 1996. The fetal heart in diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 23:795-812.
14. Migliazza L, Otten C, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1999. Cardiovascular malformations in congenital diaphragmatic hernia: human and experimental studies. *J Pediatr Surg* 34:1352-1358.
15. Martinez-Frias ML. 1996. Epidemiological analysis of the association of congenital diaphragmatic hernia with upper-limb deficiencies: a primary polytopic developmental field defect. *Am J Med Genet* 62:68-70.
16. Benjamin DR, Juul S, Siebert JR. 1988. Congenital posterolateral diaphragmatic hernia: associated malformations. *J Pediatr Surg* 23:899-903.

17. Bajaj P, Tayal A, Logani KB, Bhan S. 1991. Congenital diaphragmatic hernia: a retrospective autopsy study. *Indian Pediatr* 28:495-500.
18. Bittar Z. 1998. Major congenital malformations presenting in the first 24 hours of life in 3865 consecutive births in south of Beirut. Incidence and pattern. *J Med Liban* 46:256-260.
19. Larsen W 2003 *Embriología Humana*. Elsevier Science, Madrid.
20. Kluth D, Keijzer R, Hertl M, Tibboel D. 1996. Embryology of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 5:224-233.
21. Iritani I. 1984. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol* 169:133-139.
22. Kluth D, Losty PD, Schnitzer JJ, Lambrecht W, Donahoe PK. 1996. Toward understanding the developmental anatomy of congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 23:655-669.
23. You LR, Takamoto N, Yu CT, Tanaka T, Kodama T, Demayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ. 2005. Mouse lacking COUP-TFII as an animal model of Bochdalek-type congenital diaphragmatic hernia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16351-16356.
24. Baglaj M. 2004. Late-presenting congenital diaphragmatic hernia in children: a clinical spectrum. *Pediatr Surg Int* 20:658-669.
25. Mortell A, Montedonico S, Puri P. 2006. Animal models in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int* 22:111-128.
26. Pringle KC. 1986. In utero surgery. *Adv Surg* 19:101-138.
27. Bohn D, Tamura M, Perrin D, Barker G, Rabinovitch M. 1987. Ventilatory predictors of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia, confirmed by morphologic assessment. *J Pediatr* 111:423-431.
28. Vacanti JP, Crone RK, Murphy JD, Smith SD, Black PR, Reid L, Hendren WH. 1984. The pulmonary hemodynamic response to perioperative anesthesia in the treatment of high-risk infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 19:672-679.
29. Harrison MR, Adzick NS, Nakayama DK, deLorimier AA. 1985. Fetal diaphragmatic hernia: fetal but fixable. *Semin Perinatol* 9:103-112.
30. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Nakayama DK, Manning FA, deLorimier AA. 1985. Diaphragmatic hernia in the fetus: prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. *J Pediatr Surg* 20:357-361.
31. Adzick NS, Vacanti JP, Lillehei CW, O'Rourke PP, Crone RK, Wilson JM. 1989. Fetal diaphragmatic hernia: ultrasound diagnosis and clinical outcome in 38 cases. *J Pediatr Surg* 24:654-657.
32. Wilson JM, Fauza DO, Lund DP, Benacerraf BR, Hendren WH. 1994. Antenatal diagnosis of isolated congenital diaphragmatic hernia is not an indicator of outcome. *J Pediatr Surg* 29:815-819.
33. Sharland GK, Lockhart SM, Heward AJ, Allan LD. 1992. Prognosis in fetal diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 166:9-13.

34. Crawford DC, Wright VM, Drake DP, Allan LD. 1989. Fetal diaphragmatic hernia: the value of fetal echocardiography in the prediction of postnatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 96:705-710.
35. Thorpe-Beeston JG, Gosden CM, Nicolaides KH. 1989. Prenatal diagnosis of congenital diaphragmatic hernia: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Ther* 4:21-28.
36. Crawford DC, Drake DP, Kwaitkowski D, Chapman MG, Allan LD. 1986. Prenatal diagnosis of reversible cardiac hypoplasia associated with congenital diaphragmatic hernia: implications for postnatal management. *J Clin Ultrasound* 14:718-721.
37. Keller RL, Glidden DV, Paek BW, Goldstein RB, Feldstein VA, Callen PW, Filly RA, Albanese CT. 2003. The lung-to-head ratio and fetoscopic temporary tracheal occlusion: prediction of survival in severe left congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 21:244-249.
38. Laudy JA, Van Gucht M, Van Dooren MF, Wladimiroff JW, Tibboel D. 2003. Congenital diaphragmatic hernia: an evaluation of the prognostic value of the lung-to-head ratio and other prenatal parameters. *Prenat Diagn* 23:634-639.
39. Deprest J, Jani J, Gratacos E, Vandecruys H, Naulaers G, Delgado J, Greenough A, Nicolaides K. 2005. Fetal intervention for congenital diaphragmatic hernia: the European experience. *Semin Perinatol* 29:94-103.
40. Arkovitz MS, Russo M, Devine P, Budhorick N, Stolar CJ. 2007. Fetal lung-head ratio is not related to outcome for antenatal diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 42:107-110.
41. Boix-Ochoa J, Peguero G, Seijo G, Natal A, Canals J. 1974. Acid-base balance and blood gases in prognosis and therapy of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 9:49-57.
42. Norden MA, Butt W, McDougall P. 1994. Predictors of survival for infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 29:1442-1446.
43. Greenwald H, Steiner M. 1929. Diaphragmatic hernia in infancy and childhood. *Am J Dis Child* 38:361-362.
44. Suen HC, Bloch KD, Donahoe PK. 1994. Antenatal glucocorticoid corrects pulmonary immaturity in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Res* 35:523-529.
45. Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ. 1995. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen- induced CDH rat model. *J Pediatr Surg* 30:420-426.
46. Losty PD, Pacheco BA, Manganaro TF, Donahoe PK, Jones RC, Schnitzer JJ. 1996. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary morphology in rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Surg Res* 65:42-52.
47. Okoye BO, Losty PD, Fisher MJ, Wilmott I, Lloyd DA. 1998. Effect of dexamethasone on endothelial nitric oxide synthase in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 78:F204-208.
48. Okoye BO, Losty PD, Lloyd DA, Gosney JR. 1998. Effect of prenatal glucocorticoids on pulmonary vascular muscularisation in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 33:76-80.

49. Migliazza L, Xia HM, Arnaiz A, Alvarez JI, Alfonso LF, Diez-Pardo JA, Valls i Soler A, Tovar JA. 2000. Prenatal dexamethasone rescues heart hypoplasia in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 35:1757-1761.
50. Losada A, Tovar JA, Xia HM, Diez-Pardo JA, Santisteban P. 2000. Down-regulation of thyroid transcription factor-1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoids. *Endocrinology* 141:2166-2173.
51. Lally KP, Bagolan P, Hosie S, Lally PA, Stewart M, Cotten CM, Van Meurs KP, Alexander G. 2006. Corticosteroids for fetuses with congenital diaphragmatic hernia: can we show benefit? *J Pediatr Surg* 41:668-674.
52. Suen HC, Losty P, Donahoe PK, Schnitzer JJ. 1994. Combined antenatal thyrotropin-releasing hormone and low-dose glucocorticoid therapy improves the pulmonary biochemical immaturity in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 29:359-363.
53. Islam S, Narra V, Cote GM, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ. 1999. Prenatal vitamin E treatment improves lung growth in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 34:172-176.
54. Gonzalez-Reyes S, Alvarez L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 2003. Prenatal vitamin E improves lung and heart hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 19:331-334.
55. Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Martinez-Calonge W, Fernandez-Dumont V, Tovar JA. 2006. Effects of Nitrofen and Vitamins A, C and E on Maturation of Cultured Human H441 Pneumocytes. *Biol Neonate* 90:9-16.
56. Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Tovar JA. 2005. Effects of prenatal vitamins A, E, and C on the hypoplastic hearts of fetal rats with diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 40:1269-1274.
57. Adolph V, Arensman RM, Falterman KW, Goldsmith JP. 1990. Ventilatory management casebook. Congenital diaphragmatic hernia meeting criteria for extracorporeal membrane oxygenation. *J Perinatol* 10:202-205.
58. Stolar C, Dillon P, Reyes C. 1988. Selective use of extracorporeal membrane oxygenation in the management of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 23:207-211.
59. Boloker J, Bateman DA, Wung JT, Stolar CJ. 2002. Congenital diaphragmatic hernia in 120 infants treated consecutively with permissive hypercapnea/spontaneous respiration/elective repair. *J Pediatr Surg* 37:357-366.
60. Karl SR, Ballantine TV, Snider MT. 1983. High-frequency ventilation at rates of 375 to 1800 cycles per minute in four neonates with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 18:822-828.
61. Kinsella JP, Truog WE, Walsh WF, Goldberg RN, Bancalari E, Mayock DE, Redding GJ, deLemos RA, Sardesai S, McCurnin DC, Moreland SG, Cutter GR, Abman SH. 1997. Randomized, multicenter trial of inhaled nitric oxide and high- frequency oscillatory ventilation in severe, persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 131:55-62.
62. Williams R. 1982. Congenital diaphragmatic hernia: a review. *Heart Lung* 11:532-540.

63. Brands W, Kachel W, Wirth H, Joppich I, Lasch P, Varnholt V. 1992. Indication for using extracorporeal membrane oxygenation in congenital diaphragmatic hernias and pulmonary hypoplasia. *Eur J Pediatr Surg* 2:81-86.
64. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9269.
65. Kinsella JP, Parker TA, Ivy DD, Abman SH. 2003. Noninvasive delivery of inhaled nitric oxide therapy for late pulmonary hypertension in newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr* 142:397-401.
66. Okuyama H, Kubota A, Oue T, Kuroda S, Ikegami R, Kamiyama M, Kitayama Y, Yagi M. 2002. Inhaled nitric oxide with early surgery improves the outcome of antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 37:1188-1190.
67. Mercier JC, Lacaze T, Storme L, Roze JC, Dinh-Xuan AT, Dehan M. 1998. Disease-related response to inhaled nitric oxide in newborns with severe hypoxaemic respiratory failure. French Paediatric Study Group of Inhaled NO. *Eur J Pediatr* 157:747-752.
68. Moya FR, Lally KP. 2005. Evidence-based management of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol* 29:112-117.
69. Salguero E, Gonzalez de Dios J, Garcia del Rio M, Sanchez Diaz F. 2005. Controversias en el manejo terapeutico de la hernia diafragmatica congenita: actualizacion a traves de la medicina basada en pruebas. *Cir Pediatr* 18:170-181.
70. Shehata SM, Sharma HS, Mooi WJ, Tibboel D. 2006. Pulmonary hypertension in human newborns with congenital diaphragmatic hernia is associated with decreased vascular expression of nitric-oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* 44:147-155.
71. Karamanoukian HL, Peay T, Love JE, Abdel-Rahman E, Dandonna P, Azizkhan RG, Glick PL. 1996. Decreased pulmonary nitric oxide synthase activity in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 31:1016-1019.
72. Wigglesworth JS, Desai R, Guerrini P. 1981. Fetal lung hypoplasia: biochemical and structural variations and their possible significance. *Arch Dis Child* 56:606-615.
73. Alfonso LF, Sasieta M, Ingunza N, Lopez de Torre B, Aldazabal P, Alvarez FJ, Vilanova J, Valls i Soler A, Tovar JA. 1992. El surfactante pulmonar en la hernia diafragmática congénita experimental. *Cir Pediatr* 5:197-202.
74. Asabe K, Tsuji K, Handa N, Kurosaka N, Kajiwarra M. 1997. Immunohistochemical distribution of surfactant apoprotein-A in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 32:667-672.
75. Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Possmayer F, Harbottle R, Kay S, Khalife S, Piedboeuf B. 2001. Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and prenatal steroids in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36:122-127.
76. Glick PL, Stannard VA, Leach CL, Rossman J, Hosada Y, Morin FC, Cooney DR, Allen JE, Holm B. 1992. Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia II: the fetal lamb CDH model is surfactant deficient. *J Pediatr Surg* 27:382-387.

77. Bos AP, Tibboel D, Hazebroek FW, Molenaar JC, Lachmann B, Gommers D. 1991. Surfactant replacement therapy in high-risk congenital diaphragmatic hernia. *Lancet* 338:1279.
78. Glick PL, Leach CL, Besner GE, Egan EA, Morin FC, Malanowska-Kantoch A, Robinson LK, Brody A, Lele AS, McDonnell M, et al. 1992. Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia. III: Exogenous surfactant therapy for the high-risk neonate with CDH. *J Pediatr Surg* 27:866-869.
79. Lotze A, Knight GR, Anderson KD, Hull WM, Whitsett JA, O'Donnell RM, Martin G, Bulas DI, Short BL. 1994. Surfactant (beractant) therapy for infants with congenital diaphragmatic hernia on ECMO: evidence of persistent surfactant deficiency. *J Pediatr Surg* 29:407-412.
80. Van Meurs K. 2004. Is surfactant therapy beneficial in the treatment of the term newborn infant with congenital diaphragmatic hernia? *J Pediatr* 145:312-316.
81. Lally KP, Lally PA, Langham MR, Hirschl R, Moya FR, Tibboel D, Van Meurs K. 2004. Surfactant does not improve survival rate in preterm infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 39:829-833.
82. Harrison MR, Golbus MS, Filly RA, Nakayama DK, deLorimier AA. 1982. Fetal surgical treatment. *Pediatr Ann* 11:896-899, 901-893.
83. Hazebroek FW, Tibboel D, Bos AP, Pattenier AW, Madern GC, Bergmeijer JH, Molenaar JC. 1988. Congenital diaphragmatic hernia: impact of preoperative stabilization. A prospective pilot study in 13 patients. *J Pediatr Surg* 23:1139-1146.
84. Goh DW, Drake DP, Brereton RJ, Kiely EM, Spitz L. 1992. Delayed surgery for congenital diaphragmatic hernia. *Br J Surg* 79:644-646.
85. Iwanaka T, Tamura M, Tanaka K, Komuro H, Tsuchida Y, Okai T. 1994. Congenital diaphragmatic hernia treated by perinatal stabilization. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 20:115-120.
86. Reyes C, Chang LK, Waffarn F, Mir H, Warden MJ, Sills J. 1998. Delayed repair of congenital diaphragmatic hernia with early high- frequency oscillatory ventilation during preoperative stabilization. *J Pediatr Surg* 33:1010-1014.
87. Wung JT, Sahni R, Moffitt ST, Lipsitz E, Stolar CJ. 1995. Congenital diaphragmatic hernia: survival treated with very delayed surgery, spontaneous respiration, and no chest tube. *J Pediatr Surg* 30:406-409.
88. Haugen SE, Linker D, Eik-Nes S, Kufaas T, Vik T, Eggen BM, Brubakk AM. 1991. Congenital diaphragmatic hernia: determination of the optimal time for operation by echocardiographic monitoring of the pulmonary arterial pressure. *J Pediatr Surg* 26:560-562.
89. Moffitt ST, Schulze KF, Sahni R, Wung JT, Myers MM, Stolar CJ. 1995. Preoperative cardiorespiratory trends in infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 30:604-611.
90. Ramadwar RH, Carachi R, Young DG. 1997. Collagen-coated Vicryl mesh is not a suitable material for repair of diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 32:1708-1710.
91. Kimber CP, Dunkley MP, Haddock G, Robertson L, Carey FA, Cuschieri A. 2000. Patch incorporation in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 35:120-123.

92. Settembre A, Cuccurullo D, Pisaniello D, Capasso P, Miranda L, Corcione F. 2003. Laparoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia with prosthesis: a case report. *Hernia* 7:52-54.
93. Michalevycz D, Chaimoff C. 1989. Use of a Silastic sheet for widening the abdominal cavity in the surgical treatment of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 24:265-266.
94. Hardesty RL, Griffith BP, Debski RF, Jeffries MR, Borovetz HS. 1981. Extracorporeal membrane oxygenation. Successful treatment of persistent fetal circulation following repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 81:556-563.
95. Azarow K, Messineo A, Pearl R, Filler R, Barker G, Bohn D. 1997. Congenital diaphragmatic hernia--a tale of two cities: the Toronto experience. *J Pediatr Surg* 32:395-400.
96. Frenckner B, Ehren H, Granholm T, Linden V, Palmer K. 1997. Improved results in patients who have congenital diaphragmatic hernia using preoperative stabilization, extracorporeal membrane oxygenation, and delayed surgery. *J Pediatr Surg* 32:1185-1189.
97. Irish MS, Kapur P, Glick PL. 1997. Additional considerations for inhaled nitric oxide therapy in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 12:466-467.
98. Ssemakula N, Stewart DL, Goldsmith LJ, Cook LN, Bond SJ. 1997. Survival of patients with congenital diaphragmatic hernia during the ECMO era: an 11-year experience. *J Pediatr Surg* 32:1683-1689.
99. Wilson JM, Lund DP, Lillehei CW, Vacanti JP. 1997. Congenital diaphragmatic hernia--a tale of two cities: the Boston experience. *J Pediatr Surg* 32:401-405.
100. Anthony ML, Hardee E. 2000. Extracorporeal membrane oxygenation. Saving tiny lives. *Crit Care Nurs Clin North Am* 12:211-217.
101. Kim ES, Stolar CJ. 2000. ECMO in the newborn. *Am J Perinatol* 17:345-356.
102. Kugelman A, Gangitano E, Pincros J, Tantivit P, Taschuk R, Durand M. 2003. Venovenous versus venoarterial extracorporeal membrane oxygenation in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 38:1131-1136.
103. McGahren ED, Mallik K, Rodgers BM. 1997. Neurological outcome is diminished in survivors of congenital diaphragmatic hernia requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 32:1216-1220.
104. Stolar CJ. 1996. What do survivors of congenital diaphragmatic hernia look like when they grow up? *Semin Pediatr Surg* 5:275-279.
105. Stevens TP, Chess PR, McConnochie KM, Sinkin RA, Guillet R, Maniscalco WM, Fisher SG. 2002. Survival in early- and late-term infants with congenital diaphragmatic hernia treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatrics* 110:590-596.
106. Khan AM, Lally KP. 2005. The role of extracorporeal membrane oxygenation in the management of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol* 29:118-122.

107. Harrison MR, Adzick NS, Flake AW, Jennings RW, Estes JM, MacGillivray TE, Chueh JT, Goldberg JD, Filly RA, Goldstein RB, et al. 1993. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero: VI. Hard-earned lessons. *J Pediatr Surg* 28:1411-1417.
108. Wilson JM, DiFiore JW, Peters CA. 1993. Experimental fetal tracheal ligation prevents the pulmonary hypoplasia associated with fetal nephrectomy: possible application for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 28:1433-1439.
109. DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Wilson JM. 1995. Experimental fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia: a pulmonary vascular morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 30:917-923.
110. Hashim E, Laberge JM, Chen MF, Quillen EW, Jr. 1995. Reversible tracheal obstruction in the fetal sheep: effects on tracheal fluid pressure and lung growth. *J Pediatr Surg* 30:1172-1177.
111. Luks FI, Gilchrist BF, Jackson BT, Piasecki GJ. 1996. Endoscopic tracheal obstruction with an expanding device in a fetal lamb model: preliminary considerations. *Fetal Diagn Ther* 11:67-71.
112. Bambini DA, Irish MS, Kapur P, Glick PL. 1998. Tracheal ligation in CDH: bigger may not be better. *Pediatr Surg Int* 13:537-538.
113. Hedrick MH, Estes JM, Sullivan KM, Bealer JF, Kitterman JA, Flake AW, Adzick NS, Harrison MR. 1994. Plug the lung until it grows (PLUG): a new method to treat congenital diaphragmatic hernia in utero. *J Pediatr Surg* 29:612-617.
114. Cass DL. 2005. Fetal surgery for congenital diaphragmatic hernia: the North American experience. *Semin Perinatol* 29:104-111.
115. Hirschl RB. 1996. Innovative therapies in the management of newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 5:256-265.
116. Greenspan JS, Fox WW, Rubenstein SD, Wolfson MR, Spinner SS, Shaffer TH. 1997. Partial liquid ventilation in critically ill infants receiving extracorporeal life support. Philadelphia Liquid Ventilation Consortium. *Pediatrics* 99:E2.
117. Wilcox DT, Glick PL, Karamanoukian HL, Morin FC, 3rd, Fuhrman BP, Leach C. 1997. Partial liquid ventilation and nitric oxide in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 32:1211-1215.
118. Hirschl RB, Philip WF, Glick L, Greenspan J, Smith K, Thompson A, Wilson J, Adzick NS. 2003. A prospective, randomized pilot trial of perfluorocarbon-induced lung growth in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 38:283-289.
119. Pranikoff T, Gauger PG, Hirschl RB. 1996. Partial liquid ventilation in newborn patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 31:613-618.
120. Van Meurs KP, Rhine WD, Benitz WE, Shochat SJ, Hartman GE, Sheehan AM, Starnes VA. 1994. Lobar lung transplantation as a treatment for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 29:1557-1560.
121. Lee R, Mendeloff EN, Huddleston C, Sweet SC, de la Morena M. 2003. Bilateral lung transplantation for pulmonary hypoplasia caused by congenital diaphragmatic hernia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:295-297.

122. Wilson JM, Lund DP, Lillehei CW, Vacanti JP. 1991. Congenital diaphragmatic hernia: predictors of severity in the ECMO era. *J Pediatr Surg* 26:1028-1033.
123. Lessin MS, Thompson IM, Deprez MF, Cullen ML, Whittlesey GC, Klein MD. 1995. Congenital diaphragmatic hernia with or without extracorporeal membrane oxygenation: are we making progress? *J Am Coll Surg* 181:65-71.
124. Reickert CA, Hirschl RB, Atkinson JB, Dudell G, Georgeson K, Glick P, Greenspan J, Kays D, Klein M, Lally KP, Mahaffey S, Ryckman F, Sawin R, Short BL, Stolar CJ, Thompson A, Wilson JM. 1998. Congenital diaphragmatic hernia survival and use of extracorporeal life support at selected level III nurseries with multimodality support. *Surgery* 123:305-310.
125. Downard CD, Jaksic T, Garza JJ, Dzakovic A, Nemes L, Jennings RW, Wilson JM. 2003. Analysis of an improved survival rate for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 38:729-732.
126. Stege G, Fenton A, Jaffray B. 2003. Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 112:532-535.
127. Levison J, Halliday R, Holland AJ, Walker K, Williams G, Shi E, Badawi N. 2006. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia outcome in New South Wales and the Australian Capital Territory, Australia, 1992-2001. *J Pediatr Surg* 41:1049-1053.
128. Gallot D, Coste K, Francannet C, Laurichesse H, Boda C, Ughetto S, Vanlieferinghen P, Scheye T, Vendittelli F, Labbe A, Dechelotte PJ, Sapin V, Lemery D. 2006. Antenatal detection and impact on outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 12-year experience in Auvergne, France. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 125:202-205.
129. Reid IS, Hutcherson RJ. 1976. Long-term follow-up of patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 11:939-941.
130. Muratore CS, Kharasch V, Lund DP, Sheils C, Friedman S, Brown C, Utter S, Jaksic T, Wilson JM. 2001. Pulmonary morbidity in 100 survivors of congenital diaphragmatic hernia monitored in a multidisciplinary clinic. *J Pediatr Surg* 36:133-140.
131. Vanamo K, Rintala R, Sovijarvi A, Jaaskelainen J, Turpeinen M, Lindahl H, Louhimo I. 1996. Long-term pulmonary sequelae in survivors of congenital diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 31:1096-1099.
132. D'Agostino JA. 1997. Congenital diaphragmatic hernia: what happens after discharge? *MCN Am J Matern Child Nurs* 22:263-266.
133. Falconer AR, Brown RA, Helms P, Gordon I, Baron JA. 1990. Pulmonary sequelae in survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Thorax* 45:126-129.
134. Ijsselstijn H, Tibboel D, Hop WJ, Molenaar JC, de Jongste JC. 1997. Long-term pulmonary sequelae in children with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 155:174-180.
135. Wischermann A, Holschneider AM, Hubner U. 1995. Long-term follow-up of children with diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 5:13-18.
136. West SD, Wilson JM. 2005. Follow up of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol* 29:129-133.

137. Muratore CS, Utter S, Jaksic T, Lund DP, Wilson JM. 2001. Nutritional morbidity in survivors of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36:1171-1176.
138. Van Meurs KP, Robbins ST, Reed VL, Karr SS, Wagner AE, Glass P, Anderson KD, Short BL. 1993. Congenital diaphragmatic hernia: long-term outcome in neonates treated with extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr* 122:893-899.
139. Mahle WT, Wernovsky G. 2001. Long-term developmental outcome of children with complex congenital heart disease. *Clin Perinatol* 28:235-247.
140. Sarioglu A, McGahren ED, Rodgers BM. 2000. Effects of carotid artery repair following neonatal extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Surg Int* 16:15-18.
141. Nield TA, Langenbacher D, Poulsen MK, Platzker AC. 2000. Neurodevelopmental outcome at 3.5 years of age in children treated with extracorporeal life support: relationship to primary diagnosis. *J Pediatr* 136:338-344.
142. Jaillard S, Pierrat V, Truffert P, Metois D, Riou Y, Wurtz A, Lequien P, Storme L. 2000. Two years' follow-up of newborn infants after extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Eur J Cardiothorac Surg* 18:328-333.
143. Bernbaum J, Schwartz IP, Gerdes M, D'Agostino JA, Coburn CE, Polin RA. 1995. Survivors of extracorporeal membrane oxygenation at 1 year of age: the relationship of primary diagnosis with health and neurodevelopmental sequelae. *Pediatrics* 96:907-913.
144. Stolar CJ, Crisafi MA, Driscoll YT. 1995. Neurocognitive outcome for neonates treated with extracorporeal membrane oxygenation: are infants with congenital diaphragmatic hernia different? *J Pediatr Surg* 30:366-371.
145. Nobuhara KK, Lund DP, Mitchell J, Kharasch V, Wilson JM. 1996. Long-term outlook for survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 23:873-887.
146. Lund DP, Mitchell J, Kharasch V, Quigley S, Kuehn M, Wilson JM. 1994. Congenital diaphragmatic hernia: the hidden morbidity. *J Pediatr Surg* 29:258-264.
147. Rasheed A, Tindall S, Cueny DL, Klein MD, Delaney-Black V. 2001. Neurodevelopmental outcome after congenital diaphragmatic hernia: Extracorporeal membrane oxygenation before and after surgery. *J Pediatr Surg* 36:539-544.
148. Moss RL, Chen CM, Harrison MR. 2001. Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia: a long-term follow-up study. *J Pediatr Surg* 36:152-154.
149. Koot VC, Bergmeijer JH, Bos AP, Molenaar JC. 1993. Incidence and management of gastroesophageal reflux after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 28:48-52.
150. Stolar CJ, Berdon WE, Dillon PW, Reyes C, Abramson SJ, Amodio JB. 1988. Esophageal dilatation and reflux in neonates supported by ECMO after diaphragmatic hernia repair. *AJR Am J Roentgenol* 151:135-137.
151. Stolar CJ, Levy JP, Dillon PW, Reyes C, Belamarich P, Berdon WE. 1990. Anatomic and functional abnormalities of the esophagus in infants surviving congenital diaphragmatic hernia. *Am J Surg* 159:204-207.

152. Fasching G, Huber A, Uray E, Sorantin E, Lindbichler F, Mayr J. 2000. Gastroesophageal reflux and diaphragmatic motility after repair of congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 10:360-364.
153. Kieffer J, Sapin E, Berg A, Beaudoin S, Bargo F, Helardot PG. 1995. Gastroesophageal reflux after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 30:1330-1333.
154. Sigalet DL, Nguyen LT, Adolph V, Laberge JM, Hong AR, Guttman FM. 1994. Gastroesophageal reflux associated with large diaphragmatic hernias. *J Pediatr Surg* 29:1262-1265.
155. Vanamo K, Rintala RJ, Lindahl H, Louhimo I. 1996. Long-term gastrointestinal morbidity in patients with congenital diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 31:551-554.
156. Nagaya M, Akatsuka H, Kato J. 1994. Gastroesophageal reflux occurring after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 29:1447-1451.
157. Karnak I, Senocak ME, Tanyel FC, Buyukpamukcu N. 2001. Abnormal esophageal anatomy associated with a congenital diaphragmatic hernia: report of a case. *Surg Today* 31:1005-1007.
158. Sue K, Yamada T, Hirayama Y, Tanaka N, Hirata T, Araki H. 1993. Abnormality of lower esophagus associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 8:14-16.
159. Qi B, Soto C, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1997. An experimental study on the pathogenesis of gastroesophageal reflux after repair of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 32:1310-1313.
160. Makhoul IR, Shoshany G, Smolkin T, Epelman M, Sujov P. 2001. Transient mega-esophagus in a neonate with congenital diaphragmatic hernia. *Eur Radiol* 11:867-869.
161. Jolley SG, Lorenz ML, Hendrickson M, Kurlinski JP. 1999. Esophageal pH monitoring abnormalities and gastroesophageal reflux disease in infants with intestinal malrotation. *Arch Surg* 134:747-752.
162. Castel DO, Richter JE 1999 *The esophagus*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
163. Pouderoux P, Shi G, Tatum RP, Kahrilas PJ. 1999. Esophageal solid bolus transit: studies using concurrent videofluoroscopy and manometry. *Am J Gastroenterol* 94:1457-1463.
164. Code CF, Fyke FE, Jr., Schlegel JF. 1956. The gastroesophageal sphincter in healthy human beings. *Gastroenterologia* 86:135-150.
165. Boyle JT, Altschuler SM, Nixon TE, Tuchman DN, Pack AI, Cohen S. 1985. Role of the diaphragm in the genesis of lower esophageal sphincter pressure in the cat. *Gastroenterology* 88:723-730.
166. Mittal RK, Rochester DF, McCallum RW. 1989. Sphincteric action of the diaphragm during a relaxed lower esophageal sphincter in humans. *Am J Physiol* 256:G139-144.
167. Mittal RK, Holloway RH, Penagini R, Blackshaw LA, Dent J. 1995. Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 109:601-610.

168. Cucchiara S, Staiano A, Di Lorenzo C, De Luca G, della Rocca A, Auricchio S. 1988. Pathophysiology of gastroesophageal reflux and distal esophageal motility in children with gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7:830-836.
169. Kahrilas PJ, Dodds WJ, Hogan WJ. 1988. Effect of peristaltic dysfunction on esophageal volume clearance. *Gastroenterology* 94:73-80.
170. Chen MY, Gelfand DW, Ott DJ. 1999. Reflux evaluation: correlation between pH results, esophagitis, esophageal dysmotility, patient age, and esophageal caliber. *Dis Esophagus* 12:303-305.
171. Roland J, Peters O, Piepsz A, Devis G, Jonckheer M, Ham HR. 1989. Evaluation of oesophageal transit in patients with minor peptic oesophagitis. *Nucl Med Commun* 10:161-165.
172. Csendes A, Maluenda F, Burdiles P, Henriquez A, Quesada MS, Csendes P. 1996. Prospective study of esophageal motor abnormalities in patients with gastroesophageal disease reflux according to the severity of endoscopic esophagitis. *Hepatogastroenterology* 43:394-399.
173. Vicente Y, da Rocha C, Perez-Mies B, Madero R, Tovar JA. 2004. Effect of reflux and esophagitis on esophageal volume and acid clearance in piglets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:328-337.
174. Dutta HK, Grover VP, Dwivedi SN, Bhatnagar V. 2001. Manometric evaluation of postoperative patients of esophageal atresia and tracheo-esophageal fistula. *Eur J Pediatr Surg* 11:371-376.
175. Montedonico S, Diez-Pardo JA, Possogel AK, Tovar JA. 1999. Effects of esophageal shortening on the gastroesophageal barrier: an experimental study on the causes of reflux in esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 34:300-303.
176. Takano K, Iwafuchi M, Uchiyama M, Yagi M, Ueno A, Iwasaki M. 1988. Evaluation of lower esophageal sphincter function in infants and children following esophageal surgery. *J Pediatr Surg* 23:410-414.
177. Qi BQ, Merei J, Farmer P, Hasthorpe S, Myers NA, Beasley SW, Hutson JM. 1997. The vagus and recurrent laryngeal nerves in the rodent experimental model of esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 32:1580-1586.
178. Qi BQ, Uemura S, Farmer P, Myers NA, Hutson JM. 1999. Intrinsic innervation of the oesophagus in fetal rats with oesophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 15:2-7.
179. Alfonso LF, Vilanova J, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Tovar JA. 1993. Lung growth and maturation in the rat model of experimentally induced congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 3:6-11.
180. Au-Fliegner M, Salami S, Gosche JR. 1998. Pulmonary arterioles from rats with congenital diaphragmatic hernias are hypoplastic but not hyperresponsive. *J Pediatr Surg* 33:1366-1370.
181. Baoquan Q, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1995. Intestinal rotation in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 30:1457-1462.
182. Brandsma AE, ten Have-Opbroek AA, Vulto IM, Molenaar JC, Tibboel D. 1994. Alveolar epithelial composition and architecture of the late fetal pulmonary acinus:

- an immunocytochemical and morphometric study in a rat model of pulmonary hypoplasia and congenital diaphragmatic hernia. *Exp Lung Res* 20:491-515.
183. Gosney JR, Okoye BO, Lloyd DA, Losty PD. 1999. Pulmonary neuroendocrine cells in nitrofen-induced diaphragmatic hernia and the effect of prenatal glucocorticoids. *Pediatr Surg Int* 15:180-183.
 184. Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, Archer SL. 1999. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol* 277:L423-429.
 185. Thebaud B, Barlier-Mur AM, Chailley-Heu B, Henrion-Caude A, Tibboel D, Dinh-Xuan AT, Bourbon JR. 2001. Restoring effects of vitamin A on surfactant synthesis in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1083-1089.
 186. Shima H, Oue T, Taira Y, Miyazaki E, Puri P. 2000. Antenatal dexamethasone enhances endothelin receptorB expression in hypoplastic lung in nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 35:203-207.
 187. Yu J, Gonzalez S, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 2002. Effects of early embryonal exposure to dexamethasone on malformations of neural-crest derivatives induced by nitrofen in rats. *Pediatr Surg Int* 18:606-610.
 188. Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ. 1995. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen- induced CDH rat model. *J Pediatr Surg* 30:420-426.
 189. Kitano Y, Davies P, von Allmen D, Adzick NS, Flake AW. 1999. Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Appl Physiol* 87:769-775.
 190. Karamanoukian HL, O'Toole SJ, Glick PL. 1996. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen- induced CDH rat model. *J Pediatr Surg* 31:462-463.
 191. Coleman C, Zhao J, Gupta M, Buckley S, Tefft JD, Wuenschell CW, Minoo P, Anderson KD, Warburton D. 1998. Inhibition of vascular and epithelial differentiation in murine nitrofen-induced diaphragmatic hernia. *Am J Physiol* 274:L636-646.
 192. Losada A, Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Santisteban P, Tovar JA. 1999. Lung hypoplasia caused by nitrofen is mediated by down-regulation of thyroid transcription factor TTF-1. *Pediatr Surg Int* 15:188-191.
 193. Losada A, Tovar JA, Xia HM, Diez-Pardo JA, Santisteban P. 2000. Down-regulation of thyroid transcription factor-1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoids. *Endocrinology* 141:2166-2173.
 194. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. 2003. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 53:726-730.
 195. Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Martinez-Calonge W, Fernandez-Dumont V, Tovar JA. 2006. Effects of antioxidant vitamins on molecular regulators involved in lung hypoplasia induced by nitrofen. *J Pediatr Surg* 41:1446-1452.

196. Migliazza L, Xia H, Alvarez JI, Arnaiz A, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Tovar JA. 1999. Heart hypoplasia in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 34:706-710.
197. Migliazza L, Xia H, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1999. Skeletal malformations associated with congenital diaphragmatic hernia: experimental and human studies. *J Pediatr Surg* 34:1624-1629.
198. Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1999. The tracheobronchial tree is abnormal in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 15:184-187.
199. Tovar JA, Alfonso LF, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Uriarte S, Vilanova J. 1992. The kidney in the fetal rat model of congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *J Pediatr Surg* 27:1356-1360.
200. Acosta JM, Chai Y, Meara JG, Bringas P, Jr., Anderson KD, Warburton D. 2001. Prenatal exposure to nitrofen induces Fryns phenotype in mice. *Ann Plast Surg* 46:635-640.
201. Yu J, Gonzalez S, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 2001. Neural crest-derived defects in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 17:294-298.
202. Marshall AM. 1878. The development of the cranial nerves in the chick. *Q J Microsc Sci* 18:10-40.
203. Le Douarin NM. 1980. The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286:663-669.
204. Hall BK. 1990. Evolutionary issues in craniofacial biology. *Cleft Palate J* 27:95-100.
205. Haeckel E. 1874. Die Gastraee-Theorie, die phylogenetische Classification des Thierreichs und die Homologie der Keimblätter. *Jena Z Naturwiss* 8:1-55.
206. Hall BK 1999 The neural crest in development and evolution. Springer-Verlag, New York.
207. Le Douarin NM. 1988. The Claude Bernard lecture, 1987. Embryonic chimeras: a tool for studying the development of the nervous and immune systems. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 235:1-17.
208. Le Douarin NM. 1984. Cell migrations in embryos. *Cell* 38:353-360.
209. Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. 1983. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220:1059-1061.
210. Le Douarin NM. 1984. Ontogeny of the peripheral nervous system from the neural crest and the placodes. A developmental model studied on the basis of the quail-chick chimaera system. *Harvey Lect* 80:137-186.
211. Le Douarin NM, Teillet MA. 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30:31-48.
212. Burns AJ, Champeval D, Le Douarin NM. 2000. Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol* 219:30-43.

213. Gershon MD, Chalazonitis A, Rothman TP. 1993. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *J Neurobiol* 24:199-214.
214. Newgreen DF, Southwell B, Hartley L, Allan IJ. 1996. Migration of enteric neural crest cells in relation to growth of the gut in avian embryos. *Acta Anat* 157:105-115.
215. Newgreen DF, Jahnke I, Allan IJ, Gibbins IL. 1980. Differentiation of sympathetic and enteric neurons of the fowl embryo in grafts to the chorio-allantoic membrane. *Cell Tissue Res* 208:1-19.
216. Gershon MD, Epstein ML, Hegstrand L. 1980. Colonization of the chick gut by progenitors of enteric serotonergic neurons: distribution, differentiation, and maturation within the gut. *Dev Biol* 77:41-51.
217. Payette RF, Tennyson VM, Pham TD, Mawe GM, Pomeranz HD, Rothman TP, Gershon MD. 1987. Origin and morphology of nerve fibers in the aganglionic colon of the lethal spotted (ls/ls) mutant mouse. *J Comp Neurol* 257:237-252.
218. Burns AJ, Douarin NM. 1998. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125:4335-4347.
219. Young HM, Newgreen D. 2001. Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration and differentiation. *Anat Rec* 262:1-15.
220. Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75:949-967.
221. Bolande RP. 1974. The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathol* 5:409-429.
222. Bolande RP. 1997. Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med* 17:1-25.
223. Hall BK. 1984. Genetic and epigenetic control of connective tissues in the craniofacial structures. *Birth Defects Orig Artic Ser* 20:1-17.
224. Siebert JR, Graham JM, Jr., MacDonald C. 1985. Pathologic features of the CHARGE association: support for involvement of the neural crest. *Teratology* 31:331-336.
225. Noden DM. 1986. Origins and patterning of craniofacial mesenchymal tissues. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl* 2:15-31.
226. Noden DM. 1984. Craniofacial development: new views on old problems. *Anat Rec* 208:1-13.
227. Fukiishi Y, Morriss-Kay GM. 1992. Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos. *Cell Tissue Res* 268:1-8.
228. Bockman DE, Kirby ML. 1984. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 223:498-500.
229. Beauchamp GR, Knepper PA. 1984. Role of the neural crest in anterior segment development and disease. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 21:209-214.

230. Tsokos M, Scarpa S, Ross RA, Triche TJ. 1987. Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix proteins. *Am J Pathol* 128:484-496.
231. Robertson CM, Tyrrell JC, Pritchard J. 1991. Familial neural crest tumours. *Eur J Pediatr* 150:789-792.
232. Patrone PM, Chatten J, Weinberg P. 1990. Neuroblastoma and DiGeorge anomaly. *Pediatr Pathol* 10:425-430.
233. Levard G, Boige N, Vitoux C, Aigrain Y, Boureau M, Navarro J. 1989. Neurocristopathie. Association "Maladie de Hirschsprung-ganglioneuromes et dysfonctionnement du système nerveux autonome" chez 2 enfants. *Arch Fr Pediatr* 46:595-597.
234. Gaisie G, Oh KS, Young LW. 1979. Coexistent neuroblastoma and Hirschsprung's disease--another manifestation of the neurocristopathy? *Pediatr Radiol* 8:161-163.
235. Diez Garcia R, Carrillo A, Bartolome M, Casanova A, Prieto M. 1995. Central hypoventilation syndrome associated with ganglioneuroblastoma. *Eur J Pediatr Surg* 5:292-294.
236. Bellah R, D'Andrea A, Darillis E, Fellows KE. 1989. The association of congenital neuroblastoma and congenital heart disease. Is there a common embryologic basis? *Pediatr Radiol* 19:119-121.
237. Beckwith JB. 1989. Cardiovascular malformations and the neural crest. *Pediatr Radiol* 19:122-123.
238. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. 1994. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* 8:1019-1029.
239. Franksson C, Alveryd A, Brismar B, Ostman J. 1981. Neural crest tumour syndromes. *Acta Chir Scand* 147:105-107.
240. Ogawa T, Mitsukawa T, Ishikawa T, Tamura K. 1994. Familial pheochromocytoma associated with von Recklinghausen's disease. *Intern Med* 33:110-114.
241. Qualman SJ, Green WR, Brovall C, Leventhal BG. 1986. Neurofibromatosis and associated neuroectodermal tumors: a congenital neurocristopathy. *Pediatr Pathol* 5:65-78.
242. To KW, Rabinowitz SM, Friedman AH, Merker C, Cavanaugh CP. 1989. Neurofibromatosis and neural crest neoplasms: primary acquired melanosis and malignant melanoma of the conjunctiva. *Surv Ophthalmol* 33:373-379.
243. Pearse AG. 1969. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 17:303-313.
244. Ayer-Le Lievre C, Fontaine-Perus J. 1982. The neural crest: its relations with APUD and paraneuron concepts. *Arch Histol Jpn* 45:409-427.
245. Kirby M, Stewart D. 1984. Adrenergic innervation of the developing chick heart: neural crest ablations to produce sympathetically aneural hearts. *Am J Anat* 171:295-305.

246. Kirby ML. 1987. Cardiac morphogenesis--recent research advances. *Pediatr Res* 21:219-224.
247. Kirby ML, Waldo KL. 1990. Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* 82:332-340.
248. Kirby ML, Waldo KL. 1995. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 77:211-215.
249. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. 1995. RET-deficient mice: an animal model for Hirschsprung's disease and renal agenesis. *J Int Med* 238:327-332.
250. Gagel RF. 1996. ret protooncogene mutations and endocrine neoplasia--a story intertwined with neural crest differentiation. *Endocrinology* 137:1509-1511.
251. Marshall GM, Peaston AE, Hocker JE, Smith SA, Hansford LM, Tobias V, Norris MD, Haber M, Smith DP, Lorenzo MJ, Ponder BA, Hancock JF. 1997. Expression of multiple endocrine neoplasia 2B RET in neuroblastoma cells alters cell adhesion in vitro, enhances metastatic behavior in vivo, and activates Jun kinase. *Cancer Res* 57:5399-5405.
252. Nakamura T. 1995. Genetic markers and animal models of neurocristopathy. *Histol Histopathol* 10:747-759.
253. Schimke RN. 1984. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Annu Rev Med* 35:25-31.
254. Dott MM, Wong LY, Rasmussen SA. 2003. Population-based study of congenital diaphragmatic hernia: risk factors and survival in Metropolitan Atlanta, 1968-1999. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* 67:261-267.
255. Tonks A, Wyldes M, Somerset DA, Dent K, Abhyankar A, Bagchi I, Lander A, Roberts E, Kilby MD. 2004. Congenital malformations of the diaphragm: findings of the West Midlands Congenital Anomaly Register 1995 to 2000. *Prenat Diagn* 24:596-604.
256. Neville HL, Jaksic T, Wilson JM, Lally PA, Hardin WD, Jr., Hirschl RB, Langham MR, Jr., Lally KP. 2002. Fryns syndrome in children with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 37:1685-1687.
257. Rodriguez JI, Garcia I, Alvarez J, Delicado A, Palacios J. 1994. Lethal Pallister-Killian syndrome: phenotypic similarity with Fryns syndrome. *Am J Med Genet* 53:176-181.
258. van Dooren MF, Brooks AS, Hoogeboom AJ, van den Hoonaard TL, de Klein JE, Wouters CH, Tibboel D. 2004. Early diagnosis of Wolf-Hirschhorn syndrome triggered by a life-threatening event: congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet A* 127:194-196.
259. Casaccia G, Mobili L, Braguglia A, Santoro F, Bagolan P. 2006. Distal 4p microdeletion in a case of Wolf-Hirschhorn syndrome with congenital diaphragmatic hernia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:210-213.
260. Davis C, Samarakkody U. 2002. Fryns syndrome: a surviving case with associated Hirschsprung's disease and hemidiaphragmatic agenesis. *J Paediatr Child Health* 38:318-320.

261. Alkuraya FS, Lin AE, Irons MB, Kimonis VE. 2005. Fryns syndrome with Hirschsprung disease: support for possible neural crest involvement. *Am J Med Genet A* 132:226-230.
262. Lin AE, Pober BR, Mullen MP, Slavotinek AM. 2005. Cardiovascular malformations in Fryns syndrome: is there a pathogenic role for neural crest cells? *Am J Med Genet A* 139:186-193.
263. Gonzalez T. 2003. Malformaciones craneofaciales inducidas en ratas por teratógenos que actúan sobre la cresta neural craneal. Tesis Doctoral. Pediatría. Universidad Autónoma, Madrid.
264. Yu J, Gonzalez S, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 2001. Neural crest-derived defects in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 17:294-298.
265. Martinez L, De Ceano-Vivas M, Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Calonge WM, Ruiz E, Rodriguez JI, Tovar JA. 2006. Las células C tiroideas están disminuidas en la Hernia Diafragmática Congénita experimental. *Cir Pediatr* 19:101-105.
266. Fujino H, Nakagawa M, Nishijima S, Okamoto N, Hanato T, Watanabe N, Shirai T, Kamiya H, Takeuchi Y. 2005. Morphological differences in cardiovascular anomalies induced by bis-diamine between Sprague-Dawley and Wistar rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 45:52-58.
267. Taleporos P, Salgo MP, Oster G. 1978. Teratogenic action of bis(dichloroacetyl)diamine on rats: patterns of malformations produced in high incidence at time-limited periods of development. *Teratology* 18:5-15.
268. Solomon HM, Wier PJ, Johnson CM, Posobiec LM, Rendemonti JE, Rumberger DF. 2000. Benzofuranyl ureas with potent cardiovascular teratogenicity in rats. *Teratology* 61:211-221.
269. Greenwood RD, Rosenthal A, Nadas AS. 1976. Cardiovascular abnormalities associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 57:92-97.
270. Cohen MS, Rychik J, Bush DM, Tian ZY, Howell LJ, Adzick NS, Flake AW, Johnson MP, Spray TL, Crombleholme TM. 2002. Influence of congenital heart disease on survival in children with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr* 141:25-30.
271. Hosgor M, Karaca I, Karkiner A, Ucan B, Temir G, Erdag G, Fescekoglu O. 2004. Associated malformations in delayed presentation of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 39:1073-1076.
272. Graziano JN. 2005. Cardiac anomalies in patients with congenital diaphragmatic hernia and their prognosis: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. *J Pediatr Surg* 40:1045-1049.
273. Losty PD, Connell MG, Freese R, Laval S, Okoye BO, Smith A, Kluth D, Lloyd DA. 1999. Cardiovascular malformations in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 34:1203-1207.
274. Kim WG, Suh JW, Chi JG. 1999. Nitrofen-induced congenital malformations of the heart and great vessels in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 34:1782-1786.
275. Otten C, Migliazza L, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 2000. Neural crest-derived defects in experimental esophageal atresia. *Pediatr Res* 47:178-183.

276. van Tuyl M, Post M. 2000. From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir Res* 1:30-35.
277. Spilde TL, Bhatia AM, Mehta S, Ostlie DJ, Hembree MJ, Preuett BL, Prasadan K, Li Z, Snyder CL, Gittes GK. 2003. Defective sonic hedgehog signaling in esophageal atresia with tracheoesophageal fistula. *Surgery* 134:345-350.
278. Spilde T, Bhatia A, Ostlie D, Marosky J, Holcomb G, 3rd, Snyder C, Gittes G. 2003. A role for sonic hedgehog signaling in the pathogenesis of human tracheoesophageal fistula. *J Pediatr Surg* 38:465-468.
279. Arsic D, Keenan J, Quan QB, Beasley S. 2003. Differences in the levels of Sonic hedgehog protein during early foregut development caused by exposure to Adriamycin give clues to the role of the Shh gene in oesophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 19:463-466.
280. Kim PC, Mo R, Hui Cc C. 2001. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. *J Pediatr Surg* 36:381-384.
281. Unger S, Copland I, Tibboel D, Post M. 2003. Down-regulation of sonic hedgehog expression in pulmonary hypoplasia is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 162:547-555.
282. Testaz S, Jarov A, Williams KP, Ling LE, Koteliensky VE, Fournier-Thibault C, Duband JL. 2001. Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched- Smoothed-Gli signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12521-12526.
283. Washington Smoak I, Byrd NA, Abu-Issa R, Goddeeris MM, Anderson R, Morris J, Yamamura K, Klingensmith J, Meyers EN. 2005. Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev Biol* 283:357-372.
284. Ahlgren SC, Bronner-Fraser M. 1999. Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol* 9:1304-1314.
285. Nagase T, Nagase M, Osumi N, Fukuda S, Nakamura S, Ohsaki K, Harii K, Asato H, Yoshimura K. 2005. Craniofacial anomalies of the cultured mouse embryo induced by inhibition of sonic hedgehog signaling: an animal model of holoprosencephaly. *J Craniofac Surg* 16:80-88.
286. Yamagishi C, Yamagishi H, Maeda J, Tsuchihashi T, Ivey K, Hu T, Srivastava D. 2006. Sonic hedgehog is essential for first pharyngeal arch development. *Pediatr Res* 59:349-354.
287. Fu M, Lui VC, Sham MH, Pachnis V, Tam PK. 2004. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol* 166:673-684.
288. Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriya IS, Yamagishi H, Srivastava D. 2001. Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol* 235:62-73.
289. Mark M, Rijli FM, Chambon P. 1997. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 42:421-429.

290. Pitera JE, Smith VV, Thorogood P, Milla PJ. 1999. Coordinated expression of 3' hox genes during murine embryonal gut development: an enteric Hox code. *Gastroenterology* 117:1339-1351.
291. Patel NH, Prince VE. 2000. Beyond the Hox complex. *Genome Biol* 1:REVIEWS1027.
292. Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Berard J, Jeannotte L. 1997. Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol* 192:432-445.
293. Duboule D, Morata G. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 10:358-364.
294. Manley NR, Capecchi MR. 1997. Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* 192:274-288.
295. Gehring W 1998 Master control genes in development and evolution: The homeobox story. Yale University Press, New Haven.
296. Knittel T, Kessel M, Kim MH, Gruss P. 1995. A conserved enhancer of the human and murine Hoxa-7 gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* 121:1077-1088.
297. Manley NR, Capecchi MR. 1998. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* 195:1-15.
298. Chisaka O, Capecchi MR. 1991. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene hox-1.5. *Nature* 350:473-479.
299. Condie BG, Capecchi MR. 1994. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes hoxa-3 and hoxd-3 reveal synergistic interactions. *Nature* 370:304-307.
300. Manley N, Capecchi M. 1995. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* 121:1989-2003.
301. Le Douarin N, Kalcheim C 1999 The neural crest. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
302. Boulet AM, Capecchi MR. 1996. Targeted disruption of hoxc-4 causes esophageal defects and vertebral transformations. *Dev Biol* 177:232-249.
303. Minoo P, King RJ. 1994. Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. *Annu Rev Physiol* 56:13-45.
304. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. 1998. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 20:54-57.
305. Kim PC, Mo R, Hui Cc C. 2001. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. *J Pediatr Surg* 36:381-384.
306. Kim J, Kim P, Hui CC. 2001. The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. *Clin Genet* 59:306-315.
307. Beasley SW, Diez Pardo J, Qi BQ, Tovar JA, Xia HM. 2000. The contribution of the adriamycin-induced rat model of the VATER association to our understanding of congenital abnormalities and their embryogenesis. *Pediatr Surg Int* 16:465-472.

308. Qi BQ, Merei J, Farmer P, Hasthorpe S, Hutson JM, Myers NA, Beasley SW. 1997. Tracheomalacia with esophageal atresia and tracheoesophageal fistula in fetal rats. *J Pediatr Surg* 32:1575-1579.
309. Xia H, Otten C, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1999. Tracheobronchial malformations in experimental esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 34:536-539.
310. Usui N, Kamata S, Ishikawa S, Sawai T, Okuyama H, Imura K, Okada A. 1996. Anomalies of the tracheobronchial tree in patients with esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 31:258-262.
311. Nose K, Kamata S, Sawai T, Tazuke Y, Usui N, Kawahara H, Okada A. 2000. Airway anomalies in patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 35:1562-1565.
312. Volpe MV, Martin A, Vosatka RJ, Mazzone CL, Nielsen HC. 1997. Hoxb-5 expression in the developing mouse lung suggests a role in branching morphogenesis and epithelial cell fate. *Histochem Cell Biol* 108:495-504.
313. Chinoy MR, Nielsen HC, Volpe MV. 2002. Mesenchymal nuclear transcription factors in nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Surg Res* 108:203-211.
314. Volpe MV, Vosatka RJ, Nielsen HC. 2000. Hoxb-5 control of early airway formation during branching morphogenesis in the developing mouse lung. *Biochim Biophys Acta* 1475:337-345.
315. Kondo T, Dolle P, Zakany J, Duboule D. 1996. Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development* 122:2651-2659.
316. Murphy M, Bartlett PF. 1993. Molecular regulation of neural crest development. *Mol Neurobiol* 7:111-135.
317. Yahagi N, Kosaki R, Ito T, Mitsuhashi T, Shimada H, Tomita M, Takahashi T, Kosaki K. 2004. Position-specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract. *Congenit Anom (Kyoto)* 44:18-26.
318. Fu M, Chi Hang Lui V, Har Sham M, Nga Yin Cheung A, Kwong Hang Tam P. 2003. HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev Dyn* 228:1-10.
319. Davies MR. 1996. Anatomy of the extrinsic motor nerve supply to mobilized segments of the oesophagus disrupted by dissection during repair of oesophageal atresia with distal fistula. *Br J Surg* 83:1268-1270.
320. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. 1953. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 92:189-217.
321. Major D, Cadenas M, Fournier L, Leclerc S, Lefebvre M, Cloutier R. 1998. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 13:547-549.
322. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorczy P, Gansmuller A, Chambon P. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723-2748.

323. Chen MH, MacGowan A, Ward S, Bavik C, Greer JJ. 2003. The activation of the retinoic Acid response element is inhibited in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Biol Neonate* 83:157-161.
324. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, Zhang W, Greer JJ. 2003. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol* 162:673-679.
325. Nakazawa N, Montedonico S, Takayasu H, Paradisi F, Puri P. 2007. Disturbance of retinol transportation causes nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 42:345-349.
326. Yu J, Gonzalez S, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 2002. Effects of vitamin A on malformations of neural-crest-controlled organs induced by nitrofen in rats. *Pediatr Surg Int* 18:600-605.
327. Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120:2749-2771.
328. Xia H, Migliazza L, Montedonico S, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1999. Skeletal malformations associated with esophageal atresia: clinical and experimental studies. *J Pediatr Surg* 34:1385-1392.
329. Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Navarro C, Tovar JA. 1996. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report. *J Pediatr Surg* 31:498-502.
330. Cozzi F, Myers NA, Piacenti S, Orfei P, Cozzi DA, Bonanni M, Madonna L. 1993. Maturational dysautonomia and facial anomalies associated with esophageal atresia: support for neural crest involvement. *J Pediatr Surg* 28:798-801.
331. Cozzi DA, Capocaccia P, Roggini M, Matrunola M, Morini F, Cozzi F. 2001. Respiratory status of infants with esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 17:92-96.
332. Cozzi DA, Zani A, Conforti A, Colarizi P, Moretti C, Cozzi F. 2006. Pathogenesis of apparent life-threatening events in infants with esophageal atresia. *Pediatr Pulmonol* 41:488-493.
333. Morini F, Cozzi DA, Ilari M, Casati A, Cozzi F. 2001. Pattern of cardiovascular anomalies associated with esophageal atresia: support for a caudal pharyngeal arch neurocristopathy. *Pediatr Res* 50:565-568.
334. Morini F, Pacilli M. 2004. Infant with esophageal atresia and tracheoesophageal fistula associated with DiGeorge syndrome. *J Pediatr Surg* 39:1301; author reply 1301-1302.
335. Martinez L, Ceano-Vivas MD, Gonzalez-Reyes S, Hernandez F, Fernandez-Dumont V, Calonge WM, Ruiz E, Rodriguez JI, Tovar JA. 2005. Decrease of parafollicular thyroid C-cells in experimental esophageal atresia: further evidence of a neural crest pathogenic pathway. *Pediatr Surg Int* 21:175-179.
336. Palacios J, Gamallo C, Garcia M, Rodriguez J. 1993. Decrease in thyrocalcitonin-containing cells and analysis of other congenital anomalies in 11 patients with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet* 46:641-646.

337. Gamallo C, Garcia M, Palacios J, Rodriguez J. 1993. Decrease in calcitonin-containing cells in truncus arteriosus. *Am J Med Genet* 46:149-153.
338. Encinas JL, Luis AL, Avila LF, Martinez L, Guereta L, Lassaletta L, Tovar JA. 2006. Impact of preoperative diagnosis of congenital heart disease on the treatment of esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 22:150-153.
339. Nakazato Y, Landing BH, Wells TR. 1986. Abnormal Auerbach plexus in the esophagus and stomach of patients with esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *J Pediatr Surg* 21:831-837.
340. Qi B, Soto C, Diez-Pardo JA, Tovar JA. 1997. An experimental study on the pathogenesis of gastroesophageal reflux after repair of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 32:1310-1313.
341. Cheng W, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. 1999. Abnormal enteric nerve morphology in atretic esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 15:8-10.
342. Qi BQ, Beasley SW. 1999. Relationship of the notochord to foregut development in the fetal rat model of esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 34:1593-1598.
343. Costlow RD, Manson JM. 1981. The heart and diaphragm: target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). *Toxicology* 20:209-227.
344. Stone LC, Manson JM. 1981. Effects of the herbicide 2, 4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (nitrofen) on fetal lung development in rats. *Toxicology* 20:195-207.
345. Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, Lambrecht W. 1990. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 25:850-854.
346. Tenbrinck R, Tibboel D, Gaillard JL, Kluth D, Bos AP, Lachmann B, Molenaar JC. 1990. Experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 25:426-429.
347. Tenbrinck R, Gaillard JL, Tibboel D, Kluth D, Lachmann B, Molenaar JC. 1992. Pulmonary vascular abnormalities in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 27:862-865.
348. Brandsma AE, Tibboel D, Vulto IM, Egberts J, Ten Have-Opbroek AA. 1993. Ultrastructural features of alveolar epithelial cells in the late fetal pulmonary acinus: a comparison between normal and hypoplastic lungs using a rat model of pulmonary hypoplasia and congenital diaphragmatic hernia. *Microsc Res Tech* 26:389-399.
349. Suen HC, Catlin EA, Ryan DP, Wain JC, Donahoe PK. 1993. Biochemical immaturity of lungs in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 28:471-475.
350. Qi B, Diez-Pardo JA, Rodriguez JI, Tovar JA. 1996. Experimental ureterohydronephrosis in fetal rats. *J Pediatr Surg* 31:1247-1251.
351. Tovar JA, Qi B, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Valls-i-Soler A, Morreale de Escobar G. 1997. Thyroid hormones in the pathogenesis of lung hypoplasia and immaturity induced in fetal rats by prenatal exposure to nitrofen. *J Pediatr Surg* 32:1295-1297.

352. Teramoto H, Guarino N, Puri P. 2001. Altered gene level expression of thyroid hormone receptors alpha-1 and beta-1 in the lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36:1675-1678.
353. Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, Post M. 2000. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 156:1299-1306.
354. Guarino N, Shima H, Puri P. 2001. Cardiac gene expression and synthesis of atrial natriuretic peptide in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia in rats: effect of prenatal dexamethazone treatment. *J Pediatr Surg* 36:1497-1501.
355. Hosgor M, Ijzendoorn Y, Mooi WJ, Tibboel D, De Krijger RR. 2002. Thyroid transcription factor-1 expression during normal human lung development and in patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 37:1258-1262.
356. Lemke RP, Zhang W, Balcerazak D, Kobayashi K, Schwingshackl A, Cheung PY, Dixon WT, Baracos VE, Greer JJ. 2003. Expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in rat lungs during the perinatal period and in diaphragmatic hernia. *Exp Lung Res* 29:261-276.
357. Unemoto K, Sakai M, Shima H, Guarino N, Puri P. 2003. Increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the lung of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int* 19:365-370.
358. Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Martinez-Calonge W, Martinez L, Hernandez F, Tovar J. 2005. Pax3 mRNA is decreased in the hearts of rats with experimental diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 21:203-207.
359. Warburton D, Bellusci S, De Langhe S, Del Moral PM, Fleury V, Mailleux A, Tefft D, Unbekandt M, Wang K, Shi W. 2005. Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res* 57:26R-37R.
360. Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Calonge WM, Martinez L, Tovar JA. 2006. Vitamin A improves Pax3 expression that is decreased in the heart of rats with experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 41:327-330.
361. Schnitzer JJ, Hedrick HL, Pacheco BA, Losty PD, Ryan DP, Doody DP, Donahoe PK. 1996. Prenatal glucocorticoid therapy reverses pulmonary immaturity in congenital diaphragmatic hernia in fetal sheep. *Ann Surg* 224:430-437.
362. Taira Y, Miyazaki E, Ohshiro K, Yamataka T, Puri P. 1998. Administration of antenatal glucocorticoids prevents pulmonary artery structural changes in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 33:1052-1056.
363. Morriss-Kay GM, Sokolova N. 1996. Embryonic development and pattern formation. *Faseb J* 10:961-968.
364. Moro Balbas JA, Gato A, Alonso Revuelta MI, Pastor JF, Repressa JJ, Barbosa E. 1993. Retinoic acid induces changes in the rhombencephalic neural crest cells migration and extracellular matrix composition in chick embryos. *Teratology* 48:197-206.
365. Hart RC, McCue PA, Ragland WL, Winn KJ, Unger ER. 1990. Avian model for 13-cis-retinoic acid embryopathy: demonstration of neural crest related defects. *Teratology* 41:463-472.

366. Newgreen D, Young HM. 2002. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5:329-349.
367. Ayer-Le Lievre CS, Le Douarin NM. 1982. The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras. *Dev Biol* 94:291-310.
368. Burns AJ, Le Douarin NM. 2001. Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat Rec* 262:16-28.
369. Kuratani SC, Miyagawa-Tomita S, Kirby ML. 1991. Development of cranial nerves in the chick embryo with special reference to the alterations of cardiac branches after ablation of the cardiac neural crest. *Anat Embryol* 183:501-514.
370. Mittal RK 1999 Pathophysiology of gastroesophageal reflux. In Castell DO, Richter JE (eds) *The Esophagus*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 397-419.
371. Orringer MB, Kirsh MM, Sloan H. 1977. Long-term esophageal function following repair of esophageal atresia. *Ann Surg* 186:436-443.
372. Ashcraft KW, Goodwin C, Amoury RA, Holder TM. 1977. Early recognition and aggressive treatment of gastroesophageal reflux following repair of esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 12:317-321.
373. Pieretti R, Shandling B, Stephens CA. 1974. Resistant esophageal stenosis associated with reflux after repair of esophageal atresia: a therapeutic approach. *J Pediatr Surg* 9:355-357.
374. Freyschuss U, Lannergren K, Frenckner B. 1984. Lung function after repair of congenital diaphragmatic hernia. *Acta Paediatr Scand* 73:589-593.
375. Atkinson JB, Poon MW. 1992. ECMO and the management of congenital diaphragmatic hernia with large diaphragmatic defects requiring a prosthetic patch. *J Pediatr Surg* 27:754-756.
376. Lally KP, Paranka MS, Roden J, Georgeson KE, Wilson JM, Lillehei CW, Breaux CW, Jr., Poon M, Clark RH, Atkinson JB. 1992. Congenital diaphragmatic hernia. Stabilization and repair on ECMO. *Ann Surg* 216:569-573.
377. Berdon WE, Baker DH, Amoury R. 1968. The role of pulmonary hypoplasia in the prognosis of newborn infants with diaphragmatic hernia and eventration. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 103:413-421.
378. Peters-van der Sanden MJ, Kirby ML, Gittenberger-de Groot A, Tibboel D, Mulder MP, Meijers C. 1993. Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut. *Dev Dyn* 196:183-194.
379. Allen SP, Bogardi JP, Barlow AJ, Mir SA, Qayyum SR, Verbeek FJ, Anderson RH, Francis-West PH, Brown NA, Richardson MK. 2001. Misexpression of noggin leads to septal defects in the outflow tract of the chick heart. *Dev Biol* 235:98-109.
380. Griffini P, Smorenburg SM, Verbeek FJ, van Noorden CJ. 1997. Three-dimensional reconstruction of colon carcinoma metastases in liver. *J Microsc* 187 (Pt 1):12-21.

381. van Raaij EJ, ten Berge D, Hage W, Brouwer A, Meijlink F, Maintz JB, Verbeek FJ. 2001. Automated topographical cell proliferation analysis. *Cytometry* 45:13-18.
382. Wagenaar GT, Moorman AF, Chamuleau RA, Deutz NE, De Gier C, De Boer PA, Verbeek FJ, Lamers WH. 1994. Vascular branching pattern and zonation of gene expression in the mammalian liver. A comparative study in rat, mouse, cynomolgus monkey, and pig. *Anat Rec* 239:441-452.
383. Watanabe Y, Ando H, Seo T, Kaneko K, Katsuno S, Shinohara T, Mori K, Toriwaki J. 2003. Three-dimensional image reconstruction of an anorectal malformation with multidetector-row helical computed tomography technology. *Pediatr Surg Int* 19:167-171.
384. Baldock RA, Verbeek FJ, Vonesch JL. 1997. 3-D Reconstructions for graphical databases of gene expression. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 8:499-507.
385. Correia-Pinto J, Baptista MJ, Estevao-Costa J, Carvalho JL, Ferreira A, Areias JC, Leite-Moreira AF. 2000. Heart-related indices in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 35:1449-1452.
386. Csendes A, Smok G, Braghetto I, Gonzalez P, Henriquez A, Csendes P, Pizurno D. 1992. Histological studies of Auerbach's plexuses of the oesophagus, stomach, jejunum, and colon in patients with achalasia of the oesophagus: correlation with gastric acid secretion, presence of parietal cells and gastric emptying of solids. *Gut* 33:150-154.
387. Singaram C, SenGupta A. 1996. Histopathology of the enteric neuropathies. From silver staining to immunohistochemistry. *Gastroenterol Clin North Am* 25:183-201.
388. Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Sulkowska M, Chyczewski L. 2002. Suitability of selected markers for identification of elements of the Intestinal Nervous System (INS). *Eur J Pediatr Surg* 12:397-401.
389. Nakazato Y, Landing BH. 1986. Reduced number of neurons in esophageal plexus ganglia in Down syndrome: additional evidence for reduced cell number as a basic feature of the disorder. *Pediatr Pathol* 5:55-63.
390. Tsai YH, Gariepy CE. 2005. Dynamic changes in the proximal gut neural crest stem cell population are associated with successful development of the distal enteric nervous system in rats. *Pediatr Res* 58:636-643.
391. Martinez L, Gonzalez-Reyes S, Burgos E, Tovar JA. 2004. The vagus and recurrent laryngeal nerves in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 20:253-257.
392. Cai WQ, Gabella G. 1983. Innervation of the gall bladder and biliary pathways in the guinea-pig. *J Anat* 136:97-109.
393. Nemeth L, O'Briain S, Puri P. 1999. Whole-mount NADPH-diaphorase histochemistry is a reliable technique for the intraoperative evaluation of extent of aganglionosis. *Pediatr Surg Int* 15:195-197.
394. Nemeth L, Fourcade L, Puri P. 2000. Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric and antimesenteric sides of small bowel in premature infants. *J Pediatr Surg* 35:748-752.

395. Nemeth L, Yoneda A, Kader M, Devaney D, Puri P. 2001. Three-dimensional morphology of gut innervation in total intestinal aganglionosis using whole-mount preparation. *J Pediatr Surg* 36:291-295.
396. Rolle U, Andersen HL, Puri P, Djurhuus JC. 2002. Innervation of congenitally hydronephrotic and normal porcine upper urinary tract. *BJU Int* 89:566-570.
397. Pirker ME, Montedonico S, Rolle U, Austvoll H, Puri P. 2005. Regional differences in nitrergic neuronal density in the developing porcine urinary bladder. *Pediatr Surg Int* 21:161-168.
398. O'Donnell AM, Bannigan J, Puri P. 2006. Differences in nitrergic innervation of the developing chick cloaca and colorectum. *Pediatr Surg Int* 22:90-94.
399. Yanagihara J, Shimotake T, Deguchi E, Iwai N. 1992. Histological investigation of the myenteric plexus of the entire gut in an infant with hypogenesis of the intestine. *Eur J Pediatr Surg* 2:114-117.
400. Galvis DA, Ang SM, Wells TR, Landing BH, Romansky SG. 1992. Microdissection study of the myenteric plexus in acardia, ataxia-telangiectasia, cystic fibrosis, extrahepatic biliary atresia, pediatric AIDS and Werdnig-Hoffmann disease. *Pediatr Pathol* 12:385-395.